

Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Pneumologie

Direktor: Prof. Dr. med. C. Vogelmeier

des Fachbereichs

Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Marburg

**Die Effekte der Augmentationstherapie auf systemische sowie
pulmonale Inflammationsmarker beim hereditären
 α 1-Antitrypsinmangel**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung

des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Severin Thomas Schmid

aus Aschaffenburg

Marburg, 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 12.09.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Rothmund

Referent: PD Dr. med. Andreas Rembert Koczulla

1. Korreferent: PD Dr. Andreas Nockher

Zusammenfassung

Hintergrund: α 1-Antitrypsin (AAT), auch als α 1-Proteinase-Inhibitor oder SERPINA1 bezeichnet, ist ein im menschlichen Blutplasma vorkommendes Protein, welches eine wichtige Funktion im Proteasen-Antiproteasen Verhältnis erfüllt. Bei entsprechender genetischer Voraussetzung kommt es zu verminderter AAT Sekretion der Leber und damit zu einem Mangel an AAT im Plasma. Der AAT-Mangel (AATM) prädisponiert zu einer früh einsetzenden und schnell voranschreitenden chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) mit Lungenemphysem und entzündlichen Lebererkrankungen. Die einzige spezifische Therapie für den AATM stellt die Substitution mit humanem AAT dar. Der Nutzen der Substitutionstherapie ist mangels eindeutigen Nachweises der Wirksamkeit in prospektiv randomisierten Studien weiterhin Gegenstand der Diskussion. Sowohl die immunmodulatorische Funktion des AAT wie auch die Rolle der bei an AATM erkrankten Patienten vermehrt auftretenden AAT-Polymere sind bisher nur unzureichend verstanden.

Ziel: Ziel dieser Arbeit war es systemische sowie lokale Inflammationsmarker bei Patienten mit hereditärem AATM in vivo als auch in vitro zu evaluieren und deren Reaktion auf die Substitution mit AAT zu untersuchen. Hierdurch sollten die antiinflammatorischen sowie die immunologischen Effekte des AAT untersucht werden. Zudem sollte der Einfluss der Substitutionstherapie mit der kommerziell erhältlichen Form Prolastin™ auf die Bildung von AAT-Polymeren erfasst und deren potentiell proinflammatorische Effekte in vitro evaluiert werden.

Methoden: Es wurden 24 AATM Patienten mit nachgewiesenem PiZZ Genotyp in die Studie eingeschlossen. 12 Patienten erhielten eine wöchentliche Substitutionstherapie mit humanem AAT und 12 erhielten keine Substitution mit AAT. Serum und EBC Proben wurden vor Substitution, 2 Stunden danach und an Tag 3 nach Substitution mit AAT bei den augmentierten Patienten gewonnen. Es erfolgte die Bestimmung des totalen sowie polymeren AAT im Serum und der Zytokine/Chemokine und des C-reaktiven Proteins (CRP) im Serum und Atemwegskondensat (*Exhaled Breath Condensate*, EBC). Für die in vitro Versuche wurden neutrophile Granulozyten von 12 PiZZ homozygoten Spendern sowie primäre humane Bronchialepithelzellen mit den verschiedenen AAT-Fraktionen stimuliert und die Zytokine/Chemokine bestimmt.

Ergebnisse: Die gemessenen AAT Spiegel sind nach Substitution von AAT signifikant höher als vor Substitution. Die AAT Konzentrationen fallen an Tag 3 nach Substitution, bleiben jedoch signifikant höher als vor Substitution. Nicht substituierte Patienten haben signifikant niedrigere AAT Spiegel als substituierte Patienten. Bei substituierten Patienten sind die Polymerkonzentrationen nach Substitution signifikant höher. IL-8 und MCP-1, aber auch IL-6, TNF und VEGF zeigen im Serum nach Substitution signifikante Schwankungen. Bei nicht augmentierten Patienten werden höhere IL-8 und niedrigere MCP-1 Werte beobachtet. Im EBC werden signifikant höhere CRP Konzentrationen bei den nicht substituierten Patienten gemessen. Im Zellversuch zeigt sich nach Stimulation mit Prolastin™ und Polymeren eine signifikant niedrigere IL-8 Sekretion der NG im Vergleich zu Monomeren. Die gemessenen IL-8 Konzentrationen nach Stimulation mit Monomer sind signifikant höher als die der Kontrolle. Bei der Stimulation der primären humanen Bronchialepithelzellen zeigen die verschiedenen Fraktionen des AAT keine unterschiedlichen Effekte auf die Sekretion von IL-6, IL-8 und MCP-1.

Schlussfolgerung: Neben seiner Funktion im Proteasen-Antiproteasen Verhältnis zeigt AAT auch eine Funktion in der Regulation des Immunsystems. Der Einfluss des substituierten AAT auf die Zytokine IL-8 und MCP-1 lässt auf eine Funktion bei der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten schließen. Im Vergleich der nicht substituierten mit den substituierten Patienten deuten die gemessenen höheren CRP Spiegel im EBC als auch die IL-8 Konzentrationen im Serum auf einen antiinflammatorischen Effekt des augmentierten AAT hin. Im Zuge der Substitution kommt es zu einem Anstieg der AAT-Polymere im Serum. Bei Stimulation der NG mit den verschiedenen AAT-Fractionen zeigen sich unterschiedliche Wirkungen, wobei sich die nachweisbare Wirkung der hochmolekularen AAT Fraktion ähnlich wie Prolastin™ verhält. Eine toxische Wirkung von nicht modifizierten AAT-Polymeren auf humane Bronchialepithelzellen konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Abstract

Background. Alpha1-antitrypsin, also referred to as alpha₁-proteinase inhibitor or SERPINA1, is an acute phase protein and one of the most abundant serine protease inhibitors in human plasma. Severe ZZ α 1-antitrypsin deficiency (AATD) is one of the proven genetic risk factors which is associated with a predisposition to develop early onset, rapidly progressive COPD where emphysema is a major component. The only specific treatment for AATD consists in the substitution of usually weekly infusion of 3-5 g alpha1-antitrypsin (AAT) (60mg/kg body weight). The major concept behind augmentation therapy with human AAT is to raise the levels of AAT and to protect tissues from destruction by proteases. Whilst biochemical efficacy is generally considered proven, clinical efficacy of AAT augmentation therapy is still debated.

Objective. To evaluate effects of Prolastin™ therapy on systemic as well as local cytokine/chemokine levels in PiZZ AAT deficiency-related emphysema patients in vivo as well as in vitro. By doing so the objective was to evaluate potential anti-inflammatory effects as well as functions of AAT that are carried out besides its role in the balance of proteases and antiproteases. Furthermore the objective was to evaluate the effects of substitution therapy on AAT polymers which are of great relevance in the current discussion of the pathogenesis of AAT related disease and their potentially associated pro-inflammatory effects.

Materials and methods. We included 24 patients with proven PiZZ genotype. Serum and exhaled breath condensate (EBC) samples from patients without (n=12) and with (n=12) weekly augmentation therapy were collected before, two hours after and on day three after AAT infusion. Concentrations of total and polymeric AAT, cytokines/chemokines and C-reactive protein were determined. Blood neutrophils isolated from 12 PiZZ homozygotic donors and primary epithelial cells were exposed to Prolastin™ or to its monomeric and polymeric fractions and cytokines/chemokines were measured in cell supernatants.

Results. AAT serum levels significantly rise directly after augmentation therapy and drop on day 3 but remain significantly higher than before augmentation and are always higher than in non-augmented patients. In augmented patients serum AAT-

Abstract

polymer concentrations significantly rise after substitution and drop to baseline levels on day three. Within a week after augmentation therapy, significant fluctuations in serum levels of especially of IL-8 and MCP-1 but also of IL-6, TNF α and VEGF were observed. When compared to augmented patients, non-augmented patients had higher IL-8 and lower MCP-1 levels, and increased CRP levels in EBC. When added for 3 h to PiZZ neutrophils, 1 mg/ml Prolastin™ and its high molecular fraction significantly reduced, whereas monomers enhanced IL-8 release relative to controls. When stimulating primary epithelial cells with Prolastin™ and its fractions, no significant differences in the secretion of IL-6, IL-8 and MCP-1 were observed.

Conclusion. Besides its role in the balance of proteases and antiproteases AAT seems to have an important function the regulation of inflammation. Its strong effects on IL-8 and MCP-1 suggest a function in the recruitment of neutrophil granulocytes and monocytes. Comparing augmented to non-augmented patients, CRP levels in EBC as well as IL-8 peak concentrations are much higher in the non-augmented subgroup which provides further evidence for the overall anti-inflammatory effect of AAT substitution. After substitution serum AAT-polymers rise remarkably. Induction of IL-8 secretion by AAT seems to be one of its pro-inflammatory properties. These are not carried out in the same way by polymers and Prolastin™ as they are by monomeric AAT when stimulating neutrophil granulocytes in vitro. A toxic effect of non-modified AAT polymers on human primary bronchial epithelial cells could not be shown in this study.

Inhalt

Zusammenfassung	3
Abstract	5
1 Einleitung.....	9
1.1 α 1-Antitrypsinmangel	9
1.1.1 Epidemiologie	9
1.1.2 Pathophysiologie	10
1.1.3 Klinik	12
1.1.4 Modulatoren der klinischen Organmanifestationen	15
1.1.5 Diagnostik	17
1.1.6 Therapie.....	22
2 Fragestellung	27
3 Material und Methoden.....	29
3.1 Patientencharakteristiken.....	29
3.2 Studienteilnehmer	29
3.3 Untersuchungsablauf.....	30
3.4 Methoden	30
3.4.1 <i>Exhaled Breath Condensate</i>	30
3.4.2 Cytometric Bead Array	31
3.4.3 <i>High Sensitivity</i> /hochsensitives CRP.....	33
3.4.4 Polymer ELISA.....	34
3.4.5 Zellversuche	34
3.4.8 Statistik.....	36
4 Ergebnisse	38
4.1 In vivo.....	38

Abstract

4.1.1	AAT Konzentrationen.....	38
4.1.2	AAT Polymer Konzentrationen	39
4.1.3	Biomarker im Serum	41
4.1.4	Biomarker im EBC	44
4.2	In vitro	46
4.2.1	Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit AAT	46
4.2.2	Stimulation von primären humanen Lungenepithelzellen mit AAT	51
5	Diskussion.....	54
6	Literaturverzeichnis.....	69
7	Anhang	80

1 Einleitung

1.1 α 1-Antitrypsinmangel

Beim genetischen AATM handelt es sich um eine autosomal kodominant vererbte Erkrankung, bei der es durch Mutationen zu einer Fehlfaltung des AAT Proteins kommt. In der Folge kommt es gehäuft zur Ausbildung einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) mit Lungenemphysem. Ebenso kommt es vermehrt zu Lebererkrankungen und einigen anderen unspezifischeren Manifestationen, wie Hautveränderungen im Sinne einer Pannikulitis und Wegener Granulomatose (Traulsen 1994; Callea et al. 1997). Erstbeschreiber des AATM waren Laurell und Eriksson, die in ihrer Veröffentlichung 1963 bei jungen Patienten mit einer schweren COPD ein Fehlen der AAT-Bande in der Serumelektrophorese beschrieben (Laurell & Eriksson 1963; Laurell & Eriksson 1965).

1.1.1 Epidemiologie

Die höchste Prävalenz des AATM findet sich im Nordwesten Europas und in Nord Amerika (Blanco et al. 2006). Anhand eines in den siebziger Jahren in Schweden durchgeführten Neugeborenen Screenings und einer weiteren in Dänemark durchgeführten Studie konnte die Prävalenz des mit den niedrigsten Serumspiegeln einhergehenden Z-Allels abgeschätzt werden. Hierbei wurden die Prävalenz des Z-Allels mit 0,026 respektive 0,049 angegeben (Sveger 1976; Dahl et al. 2002). Für das S-Allel, welches ebenfalls mit erniedrigten AAT Serumspiegeln einhergeht, wird eine höhere Prävalenz in Südeuropa angegeben. Die höchste Prävalenz findet sich auf der iberischen Halbinsel mit über 0,1400 (Martin et al. 1976). In einer weiteren Arbeit von de Serres wird davon ausgegangen, dass bei einer Bevölkerung von 4,4 Milliarden Menschen in den 58 erfassten Ländern mindestens 116 Millionen Menschen den Phänotyp PiMZ und PiMS aufweisen und bei weiteren 3,4 Millionen Menschen Allelkombinationen gefunden werden können, die zu einem AAT-Mangel führen (de Serres 2002). Schätzungen für Deutschland gehen von 12 000 homozygoten Merkmalsträgern aus, wovon etwa 4000 Personen manifest erkrankt sind (van Steenbergen 1993).

1.1.2 Pathophysiologie

AAT ist ein einkettiges, 52 kDa schweres Glykoprotein aus der Gruppe der Serin-Protease-Inhibitoren (Serpine). Es wird zum größten Teil in Hepatozyten produziert, zu einem geringeren Teil jedoch auch in anderen Zellen, unter anderem in bronchialen Epithelzellen (Cichy et al. 1997), Pneumozyten Typ II (Venembre et al. 1994), alveolären Makrophagen (Mornex et al. 1986) und neutrophilen Granulozyten (Pääkkö et al. 1996). Der codierende Genlocus befindet sich auf Chromosom 14. Zur Benennung des Genprodukts hat sich das Pi-System (Pi für Proteaseinhibitor) etabliert. Hierbei erfolgt die Benennung anhand der Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld, wobei der Buchstabe M die Normvariante bezeichnet. Alle AAT-Varianten mit einer langsameren Wanderungsgeschwindigkeit werden mit im Alphabet vorangehenden Buchstaben und die schneller wandernden Varianten entsprechend mit einem folgenden Buchstaben benannt. Bei 90 % der Bevölkerung findet sich der Genotyp PiMM.

Die beiden häufigsten für einen AATM verantwortlichen AAT-Varianten, S und Z, entstehen jeweils durch den Austausch einer einzelnen Aminosäure. So ist beim PiZ Polypeptid die Aminosäure Glu342 durch Lys342 ersetzt (Jeppsson 1976) und es kommt zur Fehlfaltung und Polymerisation des Proteins, welches in der Folge nicht mehr ausreichend sezerniert werden kann und in den Hepatozyten akkumuliert (Lomas et al. 1992). Das PiS Polypeptid entsteht durch den Austausch von Glutamin durch Valin an Position 264 (Owen et al. 1976). Bei den meisten Mutationen kommt es jedoch zur Veränderung der AAT-Polypeptidkette, ohne dass es Auswirkungen auf die Funktion des Proteins oder den Serumspiegel bei den Betroffenen hat. Homozygote PiZ Merkmalsträger erreichen häufig nur einen messbaren AAT Serumspiegel von ca. 10 % eines Gesunden. In der Folge besteht ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung einer COPD und eines Lungenemphysems. Bei heterozygoten Trägern, wie PiMS oder PiMZ, finden sich häufig nur gering erniedrigte Serumwerte ohne Zeichen einer klinischen Manifestation. Überhaupt kein AAT wird bei den sogenannten PiNull Varianten produziert.

Bei der Entstehung der typischen Manifestationen des AATM werden derzeit drei verschiedene Pathomechanismen diskutiert (Gooptu & Lomas 2008).

Einleitung

Beim ersten Mechanismus wird die intrazelluläre Bildung und Akkumulation von Polymeren in der Leber bei PiZZ AATM Patienten für die hepatischen Manifestationen des AATM verantwortlich gemacht. Intrazelluläre Polymere werden auch bei anderen Genvarianten, wie z.B. PiS, gebildet, hier jedoch nur zu einem so geringen Teil, dass es zu keinen Beeinträchtigungen durch toxische Schäden kommt. Bei diesen Polymeren handelt es sich um aneinander gelagerte AAT-Monomere. Bei der sogenannten „loop-sheet“ Polymerisation reagiert das reaktive Zentrum eines Monomers (loop) mit einer Faltblatt-Struktur eines weiteren Moleküls (sheet). Dieser Mechanismus führt zur Bildung von Oligo- und Polymeren (Lomas et al. 1992). Dieser Prozess wird unter physiologischen Bedingungen nur durch die weiter oben beschriebenen Veränderungen der Polypeptidketten möglich (Dafforn et al. 1999). Der zweite Mechanismus ist nicht einer toxischen Wirkung des AAT, sondern dem systemischen Proteinmangel zuzusprechen. Es kommt zu einem Übergewicht der beim Gesunden durch AAT antagonisierten proteolytischen Enzyme, welches zu entzündlichen Veränderungen, einem vermehrten Abbau von Lungengewebe und damit zur Ausbildung einer COPD mit Lungenemphysem führt. Als dritter Mechanismus werden proinflammatorische Wirkungen extrazellulärer Polymere diskutiert. Abnormes AAT, welches in die Blutbahn sezerniert wird, behält häufig seine Funktion als Proteinaseinhibitor, kann aber auch im Extrazellulärraum und Gewebe Polymere formen (Lomas et al. 1995). In neueren Arbeiten wurde eine chemotaktische Wirkung extrazellulärer Polymere für neutrophile Granulozyten nachgewiesen. Hierbei handelt es sich nicht um eine durch Mediatoren vermittelte Wirkung, sondern eine direkte Wirkung der Polymere (Mulgrew et al. 2004). Des Weiteren fördern Polymere die Degranulation und damit die proteolytische und proinflammatorische Wirkung der neutrophilen Granulozyten (Parmar et al. 2002). Es wurde zudem eine Verstärkung dieser Mechanismen durch oxidierende Einflüsse wie Zigarettenrauch gefunden (Alam et al. 2011). Bislang ist die Pathophysiologie der Polymere jedoch nicht vollständig verstanden.

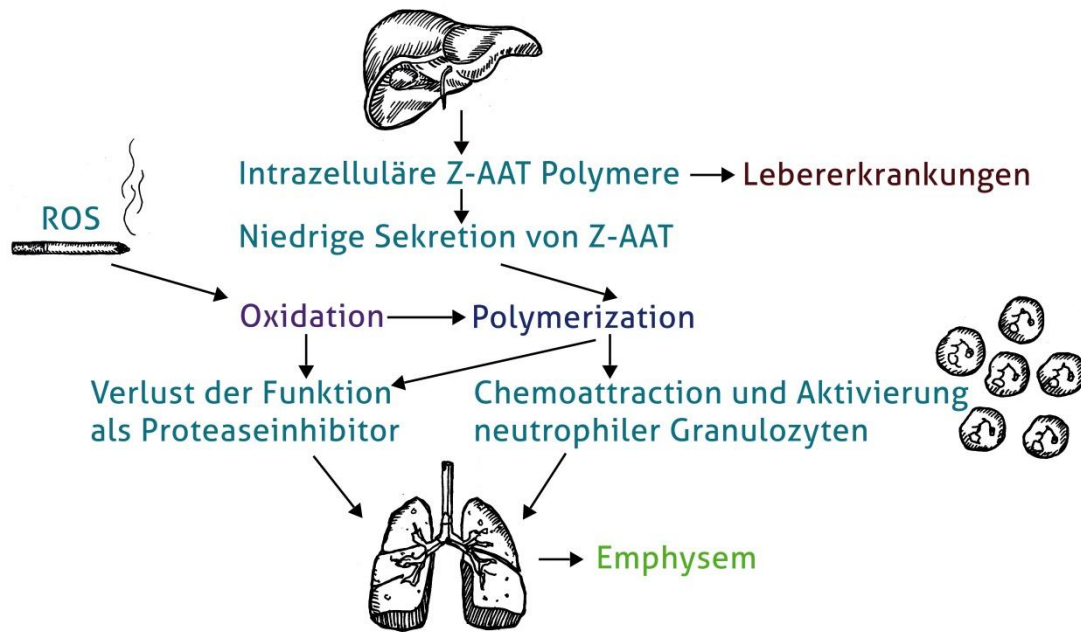


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Rolle von Z-AAT in der Pathogenese der Leber- und Lungenmanifestation.¹ (ROS = reaktive Sauerstoffspezies)

1.1.3 Klinik

Typischerweise manifestiert sich der AATM in der Lunge als eine Form der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) mit Lungenemphysem. Deutlich seltener kommt es als Folge der Retention der intrahepatisch entstandenen Polymere zu Lebererkrankungen. Einige seltenere Erkrankungen, wie die Pannikulitis und die Wegener Granulomatose werden ebenfalls mit dem AATM assoziiert, hier ist jedoch der Zusammenhang nicht eindeutig geklärt.

Klinische Organmanifestationen

Lunge

Bei der meist führenden pulmonalen Symptomatik gestaltet sich bei gleichem Genotyp das klinische Bild häufig sehr unterschiedlich. Der wichtigste zusätzliche Risikofaktor ist das Rauchen, das eine frühere Erstmanifestation und eine raschere Progression der Symptomatik verursacht. Nur wenige rauchende AATM Patienten bleiben klinisch symptomfrei. Entwickeln Raucher Symptome, sind diese meist überproportional zur

¹ Erstellt von Nicolas Ritter. In Anlehnung an Janciauskiene et al., *The discovery of α 1-antitrypsin and its role in health and disease* (Janciauskiene et al. 2011).

Einleitung

Rauchexposition ausgeprägt (Piitulainen & Eriksson 1999). Die häufigsten Symptome wurden in einer Arbeit zum deutschen α_1 -Antitrypsin-Register als Luftnot bei Belastung (61%), Husten mit (13%) oder ohne (10%) Auswurf, anfallsweise Atemnot (3%) und Luftnot in Ruhe (2 %) angegeben (Koczulla et al. 2008).

Es kommt klassischerweise schon ab der dritten Dekade zu einem schweren, basal betonten, panazinären Lungenemphysem. Hierfür wird in erster Linie das Ungleichgewicht von Proteasen und Antiproteasen verantwortlich gemacht (s.o.), zu dem es beim AATM im Lungengewebe kommt.

Neben dem klassischen mit dem AATM assoziierten klinischen Bild eines Lungenemphysems, welches primär mit obstruktiven Symptomen wie Giemen und Brummen, Dyspnoe und Abgeschlagenheit einhergeht, können zusätzlich oder auch isoliert asthmatische Beschwerden, also in erster Linie obstruktive Symptome in Verbindung mit Hyperreagibilität und Zeichen einer chronischen Bronchitis wie chronischer Husten mit Auswurf beobachtet werden (McElvaney et al. 1997; Strange et al. 2006). Es ist also davon auszugehen, dass sich ein AATM klinisch neben dem Lungenemphysem auch als chronische Bronchitis oder Asthma bronchiale manifestieren kann. Letzteres wurde zusätzlich durch Befunde gestützt, welche bei einem Teil der AAT-Mangelpatienten Atopie und erhöhte IgE Antikörperwerte zeigten (Eden et al. 1997). In einer schwedischen, auf einem Neugeborenenenscreening basierenden Kohorte von AATM Patienten mit PiZZ Genotyp wurde bis zum 22. Lebensjahr bei 15 % ein Asthma bronchiale diagnostiziert (Piitulainen & Sveger 2002). Ein gehäuftes Auftreten von asthmatischen Beschwerden beim AATM fand sich auch in einer von Eden et al. 2003 durchgeführten Studie (Eden et al. 2003).

Leber

Für die PiZ-Variante und zwei seltenere Mutationen (Siiyama und Mmalton) des AATM konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer Fehlfaltung und in der Folge zu einer Retention im Endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten der Betroffenen kommt (Carrell & Lomas 2002). Es wird angenommen, dass dieser Mechanismus für die Entstehung der mit dem AATM assoziierten Lebermanifestationen verantwortlich zu machen ist. Es gibt Hinweise darauf, dass unterschiedliche genetische

Einleitung

Voraussetzungen für die Entwicklung einer klinisch manifesten Lebererkrankung im Zusammenhang mit dem AATM prädisponieren (Pan et al. 2009).

Auch bei Betroffenen ist die Ausprägung der Erkrankung sehr unterschiedlich. In der von Sveger 1976 durchgeführten Studie wurden bei 14 von 120 Neugeborenen mit PiZ Status Hepatitiden mit posthepatischem Ikterus festgestellt. Bei 9 weiteren konnten schwere klinische und laboratorische Manifestationen und bei 5 konnten lediglich auffällige Laborwerte festgestellt werden. Bei den eingeschlossenen Neugeborenen mit PiSZ Status zeigten sich keinerlei klinische Erscheinungen und nur bei einigen Hinweise auf eine abnorme Leberfunktion in den Laborwerten (Sveger 1976).

Ebenso kann sich zu einem späteren Zeitpunkt in der Adoleszenz oder im Erwachsenenalter eine akute oder aber eine chronische Hepatitis entwickeln. Das Risiko für die Entwicklung einer Leberzirrhose und oder eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) war hier insbesondere beim männlichen Geschlecht erhöht (Elzouki et al. 1996; Eriksson et al. 1986). Die Entwicklung eines HCC setzte in diesem Zusammenhang nicht zwingend das Bestehen einer Leberzirrhose voraus (Zhou & Fischer 1998). In diesem Zusammenhang wurde eine negative Korrelation zwischen Rauchexposition und Entwicklung einer chronischen Lebererkrankung beobachtet; es wird jedoch vermutet, dass diese eher auf der fehlenden oder geringer ausgeprägten pulmonalen Symptomatik bei Nichtrauchern und damit verbundenem längerem Leben beruht als auf einem unmittelbaren kausalen Zusammenhang.

Andere klinische Manifestationen des AATM

Neben der Prädisposition zu Lungen- und Lebererkrankungen zeigen sich andere Krankheitsbilder, welche bei AATM-Patienten vermehrt auftreten können. Unter anderem kommt es zu Veränderungen an der Haut und dem Unterhautfettgewebe, der Niere und den Gefäßen.

Typische Hauterscheinungen beinhalten z.B. Urtikaria und Psoriasis. Ebenso wurde in einigen Fällen vom Auftreten einer Pannikulitis berichtet (Traulsen 1994; Edmonds et al. 1991; Albes et al. 2001). Diese tritt im Erwachsenenalter als entzündlicher nekrotisierender Prozess mit schmerzhaften roten Knoten an den Oberschenkeln in Erscheinung. In einigen Fallstudien wurde vom Auftreten renaler Erkrankungen bei

bestehendem AATM berichtet (Strife et al. 1983; Lorenzo et al. 2002). In erster Linie handelt es sich hierbei um membranoproliferative Glomerulonephritiden, aber auch andere Formen der Glomerulonephritis können auftreten (Davis et al. 1992). Da die Nierenerkrankung häufig in Kombination mit Leberschäden auftritt und bei nicht bestehender Lebererkrankung kein erhöhtes Risiko bei AATM-Patienten im Vergleich zu nicht Betroffenen bestand, ist davon auszugehen, dass bei AATM Patienten die Glomerulonephritis in Zusammenhang mit der hepatischen Erkrankung steht. Eine weitere Fallstudie berichtet zudem über einen Patienten mit homozygotem AAT-Mangel, bei welchem die Lebertransplantation zu einer drastischen Verbesserung der renalen Symptomatik führte (Elzouki et al. 1997).

Bei Patienten mit systemischer Vaskulitis, besonders in Assoziation mit Anti-Proteinase 3 Antikörpern (ANCA) und Wegener Granulomatose, wurde eine Assoziation mit AATM beschrieben (Lhotta et al. 1994; Callea et al. 1997; Elzouki et al. 1996). Nichtsdestotrotz kommt es beim AATM nur in seltenen Fällen zur Bildung von ANCA und viele entwickeln, auch wenn ANCA nachgewiesen werden können, keine Symptomatik (Lhotta et al. 1994; Audrain et al. 2001). Damit spielt der AATM wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle als Risikofaktor für Vaskulitiden.

1.1.4 Modulatoren der klinischen Organmanifestationen

Bei gleichem Genotyp kommt es zu sehr unterschiedlicher Ausprägung der mit AATM assoziierten Krankheitsbilder (Tobin et al. 1983). So konnten einige Risikofaktoren bestimmt werden, welche Einfluss auf die Progression und Ausprägung der klinischen Problematik haben. Zudem kommt es selbst bei Patienten mit ähnlichen oder gleichen Umwelteinflüssen zu großen Variationen in der Manifestationsschwere, was die Überlegungen nährte, dass auch interindividuell unterschiedliche, intrinsische Faktoren einen Einfluss haben.

Rauchen

Wichtigster Risikofaktor zur Entwicklung einer COPD und assoziierter pulmonaler Erkrankungen bei bestehendem AATM ist das Rauchen. Es konnte nachgewiesen werden, dass aktives Rauchen Einfluss auf die Progression der Lungenfunktionsverschlechterung hat. Raucher zeigten sowohl im Vergleich zu Ex-Rauchern, als auch im Vergleich zu Betroffenen, welche niemals geraucht hatten, eine

deutlich rapidere Verschlechterung der Lungenfunktionsparameter im Verlauf eines Jahres (Piitulainen & Eriksson 1999; Seersholm et al. 1995; Janus et al. 1985). Ex-Raucher und Nichtraucher zeigten ähnliche Werte. Dies spricht dafür, dass bei Aufgabe des Rauchens die Progression wieder zurück auf den Level eines Nichtrauchers sinkt. Diese Auswirkungen sind dabei keineswegs auf das höhere Alter beschränkt, sondern wie für den genetischen AATM typisch bereits in deutlich früherem Alter zu beobachten. So konnten die ersten Effekte auf FEV₁ und FEV₁/VC bei Patienten bereits im Alter ab 18 Jahren beobachtet werden (Piitulainen & Sveger 1998). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Dosisabhängigkeit der Auswirkung der Rauchexposition besteht.

Exazerbationen

Ein weiterer wichtiger Risikofaktor sind sogenannte Exazerbationen. Hierbei handelt es sich um Entzündungsschübe, welche zumeist durch rezidivierende Infekte der tiefen Atemwege verursacht werden, jedoch auch durch andere Noxen wie z.B. Ozon oder Reflux getriggert werden können (Seemungal et al. 2009). Diese gehen mit einer erhöhten entzündlichen Aktivität in der Lunge einher (Hill et al. 1999). Bei bestehendem AATM kommt es in der Konsequenz zu überschießenden inflammatorischen Prozessen und zur vermehrten Chemoattraktion von neutrophilen Granulozyten, welche wiederum vermehrt Elastase ausschütten. Mangels Inhibition durch AAT kommt es zur Destruktion des Lungenparenchyms und zur Progression des Lungenemphysems. Dieser Effekt trat in einer Studie allerdings nur bei Patienten mit relativ milde ausgeprägter obstruktiver Symptomatik und damit nur gering ausgeprägter Verminderung des FEV₁ signifikant in Erscheinung. Hier jedoch konnte eine Korrelation zwischen erhöhter Anzahl der Exazerbationen und Lungenfunktionsverschlechterung hergestellt werden (Dowson et al. 2001).

Als weitere Modulatoren des Krankheitsverlaufs der klinischen Manifestationen des AATM wurden unter anderem Umwelteinflüsse wie Gase und Stäube, Ernährung und Alkoholkonsum beschrieben. Diese spielen jedoch insgesamt eine untergeordnete Rolle (Piitulainen et al. 1997; Piitulainen & Sveger 1998; Tabak et al. 2001; Peacock et al. 2011).

1.1.5 Diagnostik

Aufgrund seiner Seltenheit und seiner relativ unspezifischen klinischen Erscheinungen bedarf es beim behandelnden Arzt zur Diagnosestellung eines Bewusstseins für die Erkrankung AATM. In vielen Fällen wird ein bestehender AATM nicht diagnostiziert. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegt häufig eine relativ lange Zeitspanne zwischen den ersten zumeist respiratorischen Symptomen und der Diagnose (Campos et al. 2005; Stoller et al. 2005). Zusätzlich erschwerend ist hierbei, dass die pulmonale Symptomatik eines AATM der nicht hereditären Form der COPD ähnelt. Entscheidend für den Verdacht auf einen AATM ist die frühe Erstmanifestation in der 3. oder 4. Dekade, die rasche Progression, Disproportionalität zwischen Rauchexposition und Krankheitsstadium und oder die familiäre Häufung. Die Testung auf AATM wird nach den Richtlinien von ATS/ERS u.a. bei COPD, nicht reversibler bronchialer Obstruktion bzw. Asthma, Lebererkrankung unklarer Genese und Pannikulitis empfohlen (s. Tabelle 1)(Summary 2003).

Tabelle 1 Indikationen zur weiteren Abklärung auf AAT-Mangel ²

Indikationen zur weiteren Abklärung auf AAT-Mangel

Genetische Testung empfohlen:

1. Symptomatische Erwachsene mit Emphysem, COPD oder Asthma mit inkompletter Reversibilität der Atemwegsobstruktion nach Behandlung mit Bronchodilatoren
2. Lebererkrankung unbekannter Genese
3. Asymptomatische Patienten mit persistierender Atemwegsobstruktion und bestehenden Risikofaktoren (Rauchen, Umweltfaktoren)
4. Pannikulitis unklarer Genese
5. Geschwister einer Person mit AATM

Genetische Testung sollte in Betracht gezogen werden:

6. Erwachsene mit Bronchiektasen unbekannter Genese
 7. C-ANCA-Vaskulitis unklarer Genese
 8. Jugendliche und asymptomatische Patienten mit persistierender Atemwegsobstruktion
 9. Bekannter AAT-Mangel in der Familie
-

² Modifiziert nach ATS/ERS (Summary 2003).

Klinische Basisdiagnostik

Die klinische Diagnostik bei AATM beinhaltet die internistische Basisdiagnostik bestehend aus Anamnese, körperlicher Untersuchung und Basislabor inklusive der Bestimmung von AAT. Zum Zeitpunkt der Diagnose sollten die Lungen- und Leberfunktion erfasst werden. Dieses beinhaltet die vollständige Lungenfunktionsdiagnostik inklusive Spirometrie, statischen Lungenvolumina, Blutgasanalyse und Diffusionskapazität. Empfohlen sind zudem die Durchführung von bildgebenden Verfahren, Röntgen oder Computertomographie zur Erfassung eventuell bestehender Lungenstrukturveränderungen. Die Leberfunktion sollte durch laboratorische sowie sonografische Untersuchung erfasst werden (Summary 2003).

Molekulare Diagnostik

Initial wird bei Verdacht auf AATM üblicherweise eine Bestimmung des AAT-Serumspiegels via Nephelometrie durchgeführt, da die Nephelometrie inzwischen von den meisten Laboratorien durchgeführt werden kann. Da AAT zu den akute-Phase Proteinen gehört und bei entzündlichen Prozessen im Körper physiologischerweise ansteigt (Borawski et al. 2003), kann es hierbei jedoch zu falsch-negativen Ergebnissen kommen. Aus diesem Grund wird eine parallele Bestimmung des C-reaktiven Proteins (CRP) empfohlen, um eine bestehende Entzündung auszuschließen. Besteht der Verdacht auf einen AATM (s.o.) und in der quantitativen Messung von AAT in Serum oder Plasma finden sich erniedrigte Werte, so wird die Genotypisierung via Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Finden sich erniedrigte Werte in der Nephelometrie oder werden Z oder S Allele in der PCR nachgewiesen oder es besteht eine Diskrepanz zwischen gemessenen Serumwerten und Ergebnis der Genotypisierung, dann erfolgt die Phänotypisierung mittels isoelektrischer Fokussierung. Bei weiterhin unklarem Ergebnis wird eine Gensequenzierung durchgeführt (Miravittles et al. 2010).

Klinische Verlaufsdiagnostik

Als diagnostischer Marker zur Beurteilung des Verlaufs von chronisch obstruktiven Erkrankungen hat sich das forcierte expiratorische Volumen in einer Sekunde (FEV₁) etabliert. Speziell beim AATM wird zusätzlich die Messung der Diffusionskapazität empfohlen (Summary 2003). Regelmäßige Lungenfunktionsdiagnostik kann anhand

Einleitung

dieser Größen Aufschluss über das Voranschreiten der Erkrankung geben. Bei gesunden Nichtrauchern findet sich ab dem 30. Lebensjahr ein Abfall des FEV_1 von 20-35 ml pro Jahr, wobei es zu großen interindividuellen Schwankungen kommen kann. Bei PiZ homozygoten Nichtrauchern beträgt die Verminderung 45 ml, bei jenen, die zusätzlich rauchen ungefähr 70 ml im Jahr (Piitulainen & Eriksson, 1999; Group, 1998). Das Lungenemphysem ist die häufigste Todesursache beim AATM (McElvaney et al. 1997). Die mittlere Überlebensrate beträgt 48-52 Jahre bei Rauchern und 60-68 Jahre bei Nichtrauchern (Dowson et al. 2001).

Regelmäßige Kontrollen der hepatischen Manifestationen des AATM werden für asymptomatische wie symptomatische Patienten empfohlen. Diese sollten aus klinischer Untersuchung, Bestimmung der Leberfunktionswerte im Serum und sonographischer Untersuchung der Leber bestehen (Summary 2003).

Eine neuere, derzeit klinisch noch nicht etablierte Methode zur Beurteilung der Ausprägung und des Voranschreitens der Erkrankung bedient sich der Lungendensitometrie. Hierbei wird mit Hilfe der Computertomographie die Dichte des Lungengewebes beurteilt. Beim AATM im Gegensatz zur nicht hereditären Form der COPD überwiegt mitunter die emphysematöse gegenüber der obstruktiven Komponente. Einige Studien zeigen, dass die Beurteilung mittels Computertomographie entsprechend eine höhere Sensitivität und Spezifität erreicht, als dies bei der auf die Mithilfe der Patienten angewiesenen Lungenfunktion der Fall ist (Bakker et al. 2005; Dirksen et al. 2009; Soejima et al. 2000). Stolk et al. konnten bei 144 Patienten, wovon 87 entweder homozygote oder heterozygote AAT-Mangelpatienten waren, mit unterschiedlich ausgeprägtem Lungenemphysem eine Überlegenheit des densitometrischen Verfahrens nachweisen. Im Vergleich zur Lungenfunktionsdiagnostik wurde dabei eine um 2,5 fach erhöhte Sensitivität erreicht (Stolk et al. 2007).

Wissenschaftliche Ansätze in der Diagnostik des AATM

Neben den oben genannten etablierten Methoden zur Diagnose und Beurteilung des Verlaufs des AATM soll im Folgenden kurz auf neuere, nicht-invasive diagnostische Methoden eingegangen werden. Diese bieten den Vorteil, dass sie mit wesentlich geringerem Aufwand für Patienten und Untersucher und mit geringeren Kosten

Einleitung

verbunden sind. Ebenso können sie zusätzliche Informationen über lokale Gegebenheiten wie z.B. entzündliche Vorgänge liefern. Von den verschiedenen bisher beschriebenen Methoden soll an dieser Stelle auf das *Exhaled Breath Condensate* (EBC) und die elektronischen Nasen eingegangen werden.

EBC

Zur Messung der molekularen Marker mit der Möglichkeit der einfachen, wiederholbaren Messung bietet das *EBC*, zumindest was unspezifische Marker wie pH und Leitfähigkeit betrifft, einen neuen und interessanten, aber auch gut reproduzierbaren Ansatz. EBC wird mit Hilfe spezieller Vorrichtungen durch Kondensation der Ausatemluft an gekühlten Oberflächen gewonnen und besteht zum größten Teil aus Wasserdampf. Es konnte gezeigt werden, dass EBC den epithelialen Flüssigkeitsfilm der Atemwege (ELF) reflektiert (Mutlu et al. 2001) und es bietet somit die Möglichkeit der Untersuchung der lokalen Gegebenheiten in der Lunge. EBC wurde bereits in vielen Studien zur Messung sowohl von unspezifischen Markern wie PH oder Leitfähigkeit (Tate et al. 2002; Hunt et al. 2000), aber auch zur Beurteilung von spezifischen Markern wie IL-1b, IL-4, IL-6 und IL-10 sowie diverser Tumormarker und auch DNA verwendet (Shahid et al. 2002; Carpagnano et al. 2003; McRae et al. 2001; Garey et al. 2004). Auch AAT konnte bereits im EBC nachgewiesen werden (Koczulla et al. 2011).

Die umfassendste Übersicht zur Standardisierung der Gewinnung von EBC stammt von Horvath et al. (Horváth et al. 2005). Bei der hier empfohlenen Sammelzeit von 10 Minuten kann bei Erwachsenen und Kindern über 4 Jahre in Ruheatmung eine Probengröße von 1-3 ml EBC gewonnen werden. Die derzeit häufigsten verwendeten Geräte zur Gewinnung von EBC sind der *RTube* (in dieser Studie verwendet) und der *ECoScreen Turbo*. Der größte Unterschied ist die beim *EcoScreen Turbo* konstante Temperatur von -5°C, wohingegen der *RTube* auf -20°C vorgekühlt wird und sich während der Untersuchung erwärmt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass zwischen den Gerätschaften keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung der gewonnenen Proben bestehen. Einen größeren Einfluss hierauf hat die Ventilation, welche entsprechend konstant gehalten werden sollte (Hüttmann et al. 2011).

Elektronische Nasen

Bei den elektronischen Nasen handelt es sich um Geräte zur Detektion von Gerüchen bzw. Substanzen in volatiler Form. Sie bedienen sich der Analyse sogenannter volatiler organischer Komponenten (VOC). Hierbei handelt es sich um flüchtige organische Substanzen, welche in der Ausatemluft nachgewiesen werden können. Die Detektion und Analyse der VOC erfolgt systemabhängig. Im Folgenden werden zwei typische Vertreter kurz vorgestellt.

Bei den Polymersensorensystemen (z.B. Cyranose 320) werden eine bestimmte Anzahl kreuzreaktiver Polymere verwendet. Diese kreuzreaktiven Sensoren reagieren auf mehrere Substanzen und einzelne Substanzen reagieren mit unterschiedlichen Sensoren. Die Reaktion des gesamten Sensorensystems auf einzelne VOC ist jedoch einzigartig und so entsteht bei Exposition mit einer bestimmten VOC Mischung ein einzigartiges Signalmuster, ein sogenannter „smellprint“. Mit Hilfe von Computerprogrammen lassen sich nun bestimmte Profile und Diskriminierungsmerkmale feststellen, welche es z.B. erlauben über Lernalgorithmen Krankheiten zu erkennen oder zu differenzieren. So konnten schon Krebspatienten, Asthmatiker und an COPD erkrankte Patienten von gesunden unterschieden werden (Dragonieri et al. 2009; Dragonieri et al. 2007; Fens et al. 2009). Ebenso gelang es die Gruppe der AATM von nicht hereditären COPD Patienten zu trennen (Hattesoehl et al. 2011). Zu beachten ist hierbei, dass diese Form der elektronischen Nasen es nicht ermöglicht einzelne Substanzen in der Ausatemluft zu benennen.

Bei der sogenannten Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) werden ebenfalls VOC nachgewiesen, sie bietet jedoch zusätzlich durch Auftrennung nach physikochemischen Eigenschaften die Möglichkeit, die nachgewiesenen Stoffe zu benennen und so ein noch differenzierteres Bild zu erstellen. Bei der IMS werden die Stoffe ionisiert und wandern durch ein elektrisches Feld auf eine Detektorplatte, wo sie ein Signal erzeugen. Dies ermöglicht eine Differenzierung der Stoffe nach ihren Eigenschaften wie Größe, Masse, Form und Ladung. Mit einer vorgeschalteten Gaschromatographie können auf diese Weise einzelne Komponenten aus einer komplexen VOC Mischung benannt werden. Auch hier wurden bereits Unterschiede in Mustern von AATM und nicht hereditären COPD Patienten beschrieben. Ebenso wurde

eine Änderung der nachweisbaren exhalieren Analyte als Reaktion auf die Substitution von AAT beobachtet (Koczulla et al. 2011).

1.1.6 Therapie

Den größten Einfluss auf den Verlauf der pulmonalen Symptomatik haben präventive Maßnahmen, in erster Linie das Aufgeben des Rauchens und Impfungen zur Vermeidung von Infekten der Atemwege. Zusätzlich sollten andere Atemwegsnoxe sowie Staub und Rauch vermieden werden. Die Therapie entspricht ansonsten der nicht hereditären COPD und beinhaltet in einem multimodalen Ansatz neben medikamentösen auch nicht medikamentöse Maßnahmen, wie die Sauerstofflangzeittherapie und die Trainingstherapie.

Medikamentöse Therapie

Die leitliniengerechte medikamentöse Therapie des AATM erfolgt analog der Empfehlungen für die COPD mit Bronchodilatoren und inhalativen Kortikosteroiden, angepasst an Stadien bzw. Schwere der Erkrankung (s. Tabelle 2).

Die einzige spezifische Therapie des Lungenemphysems bei AATM beinhaltet die intravenöse Substitution von AAT. Hierbei werden den Patienten gewöhnlich einmal wöchentlich 60 mg/kg purifiziertes AAT infundiert. Aufgrund von epidemiologisch erhobenen Daten verschiedener Allelkombinationen, welche entsprechend verschiedene Konzentrationen von AAT im Serum zur Folge haben, wurde der protektive Schwellenwert von nephelometrisch gemessenen 50 mg/dl (entspricht 80 mg/dl bei Messung via radialer Immundiffusion) festgelegt. Die erhobenen Daten zeigen, dass bei Allelkombinationen, welche eine AAT-Serumkonzentration oberhalb dieses Schwellenwerts zur Folge hatten, das Risiko der Entwicklung eines Lungenemphysems deutlich geringer ist (Stoller 1997). Aufgrund dieser Überlegung hat sich ein Therapieregime etabliert, bei dem einmal wöchentlich 60 mg/kg Körpergewicht AAT (gewöhnlich zwischen 3-5 g) infundiert werden. Hierdurch wird bei den meisten Patienten dauerhaft ein AAT Serumspiegel über dem beschriebenen protektiven Wert erreicht. Die aktuellen Leitlinien empfehlen die Durchführung der

Tabelle 2 COPD stadienadaptierte pharmakologische Therapie³

COPD Stadien	A	B	C	D
1. Wahl	SABA oder SAMA	LABA oder LAMA	ICS + LABA oder LAMA	ICS + LABA oder LAMA
2. Wahl	LABA oder LAMA oder SABA und SAMA	LABA + LAMA	LABA + LAMA	ICS + LAMA oder ICS + LABA +LAMA oder LABA + LAMA oder LAMA und PDE4 – Inhibitor oder ICS+ LABA + PDE4 – Inhibitor
Alternativ	Theophyllin	Theophyllin SABA oder SAMA	Theophyllin SABA und/oder SAMA PDE4- Inhibitoren	Theophyllin SABA und/oder SAMA

SABA: short-acting beta₂ agonist, SAMA: short-acting muscarinic antagonist, LABA: long-acting beta₂ agonist, LAMA: long-acting muscarinic antagonist, ICS: inhaled corticosteroid, PDE4-Inhibitor: Phosphodiesterase 4 Inhibitor

Augmentationstherapie bei AATM Patienten mit einer FEV₁ zwischen 30 % und 65 % (Summary 2003).

Die biochemische Wirksamkeit der Augmentationstherapie wurde in einigen Studien untersucht. Entscheidend zur Beurteilung waren hier, ob durch die Infusion Serumwerte oberhalb des protektiven Schwellenwerts erreicht werden, es hierdurch zu einem Anstieg der AAT Konzentrationen in der Lunge kommt und ob das infundierte AAT seine Funktion als Antiprotease ausführt. Wewers et al. zeigten, dass dies mit einer wöchentlichen Infusion von 60 mg/kg Körpergewicht erreicht werden kann

³ In Anlehnung an GOLD Report 2011. Die Einteilung in Risikogruppen erfolgt unter Berücksichtigung von Lungenfunktionswerten, Exazerbationshäufigkeit, mMRC- und CAT-Score. Nachzulesen in *Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2011_Feb21.pdf

(Wewers et al. 1987). In einer weiteren Studie wurden 250 mg/kg Körpergewicht alle 4 Wochen appliziert. Hier konnten AAT Serumwerte im Zielbereich an 25 von 28 Tagen erzielt werden (Hubbard et al. 1988). Nicht bestätigt werden konnte dies von Barker et al. bei einem zweiwöchentlichen Applikationsregime. Hier zeigten sich keine ausreichenden Serumspiegel sowie antiproteatische Aktivität in der Lunge (Barker et al. 1997).

Zur Beurteilung der klinischen Wirksamkeit existieren einige Beobachtungsstudien und zwei prospektiv randomisierte Studien. In einem Vergleich von 97 dänischen Ex-Rauchern und 198 deutschen Ex-Rauchern, welche eine wöchentliche Therapie erhielten, fand man keine signifikante Verlangsamung der Abnahme des FEV₁ beim Vergleich der gesamten Studienpopulation. Nur in der Subgruppe mit einem FEV₁ von 31-65 % zeigte sich eine signifikante Verlangsamung der Progression in der behandelten Studiengruppe (Seersholm et al. 1997). In einer weiteren Studie des National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) Registers konnte eine entsprechende Verlangsamung nur in der Subgruppe mit einem FEV₁ Ausgangswert von 35-49 % beobachtet werden. Zusätzlich wurde ein positiver Effekt auf die Mortalität beschrieben (NHLBI, 1998). Einen anderen Ansatz wählten Wencker et al. in dem sie die Abnahme des FEV₁ vor begonnener Substitutionstherapie und danach verglichen. Hier konnte sowohl bei Patienten mit einem Ausgangswert des FEV₁ von >65 % als auch darunter eine Verlangsamung der Progression nachgewiesen werden (Wencker et al. 2001). In zwei prospektiv randomisiert durchgeführten Studien wurde mit Hilfe der densitometrischen Beurteilung eine Verlangsamung der Progression des Lungenemphysems in der Therapiegruppe festgestellt. Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede bei der Abnahme des FEV₁ beobachtet (Dirksen et al. 1999; Dirksen et al. 2009). Mit Hilfe eines online Fragebogens stellten Liebermann et al. fest, dass die Augmentationstherapie eine Verringerung der Anzahl an Exazerbationen zur Folge hat (Lieberman 2000). Die von Stockley et al. gezeigte Verringerung des mit neutrophilen Granulozyten assoziierten Inflammationsmarkers LTB₄ lässt zudem auf eine antiinflammatorische Wirkung des substituierten AAT schließen (Stockley 2002).

Aufgrund der derzeitigen Literatur kann von einer biochemischen Wirksamkeit und Verträglichkeit der intravenösen Substitutionstherapie mit AAT ausgegangen werden.

Nichtsdestotrotz bleibt bis dato ein eindeutiger Wirkungsnachweis in prospektiv randomisierten Studien aus.

Nicht-medikamentöse Therapie

Trainingstherapie

Als Teil des multimodalen Behandlungskonzeptes der COPD wird die Trainingstherapie ab COPD-Schweregrad II empfohlen (Vogelmeier et al. 2007). Gesicherte Effekte sind unter anderem die Verbesserung der körperlichen Leistungsfähigkeit und der krankheitsspezifischen Lebensqualität und die Verminderung der Atemnot (Rabe et al. 2007). In diversen neueren Studien konnten weitere positive Effekte der Trainingstherapie gezeigt werden, welche neben der Steigerung der Muskelkraft auch eine Reduktion von Exazerbationen und der Mortalität beinhalten (Puhan et al. 2005; Troosters et al. 2010). Die number needed to treat (NNT) liegt hier mit $NNT=3$ für die Vermeidung von Exazerbationen und $NNT=6$ für die Mortalität vermutlich weit unter der NNT für die medikamentöse Therapie. Die Trainingstherapie und die medikamentöse Therapie zeigen jedoch einen additiven Effekt (Casaburi et al. 2005; Koczulla et al. 2011).

Generell sollte das Training nach einem initialen Belastungstest sowohl Ausdauer als auch Kraftübungen beinhalten und je nach Toleranz die Obergrenze der Belastung wiederholt ansteuern. Diese Übungen werden optimalerweise 3-5x die Woche über eine Dauer von 20-30 Minuten durchgeführt. Gerade in höheren Krankheitsstadien (GOLD Grad III und IV) kann ein körperliches Training häufig nur eingeschränkt durchgeführt werden, hier können intervallartige Belastungsformen sinnvoll sein. Zu beachten sind immer auch die Komorbiditäten und interindividuellen Unterschiede. So sollten die Trainingsprogramme zu Beginn individuell geplant werden (Halle et al. 2008).

Sauerstofflangzeittherapie

Bei einer Anwendung der Sauerstofflangzeittherapie über eine Dauer von mindestens 16h/Tag konnte ein positiver Effekt auf die Mortalität nachgewiesen werden (Dubois et al. 1994; Zieliński 1998). Weitere positive Effekte zeigten sich auf eine bestehende pulmonale Hypertonie, myokardiale Ischämien, allgemeine Lebensqualität und

Einleitung

körperliche Belastbarkeit (Morrison & Stovall 1992; Eaton et al. 2004). Indikationen für eine Sauerstofflangzeittherapie sind:

1. Sauerstoffpartialdruck (PaO_2) < 55 mmHg bei stabiler COPD;
2. PaO_2 55-65 mmHg, in Kombination mit einem oder mehreren der folgenden: pulmonale Hypertonie, periphere Ödemen als Hinweis auf eine Herzinsuffizienz oder ein Hämatokrit >55%.

2 Fragestellung

Die Substitutionstherapie mit humanem AAT wurde entwickelt um den Mangel an funktionellem AAT bei AATM Patienten auszugleichen und so die Entwicklung des assoziierten Lungenemphysems zu verhindern. Sie wird in vielen Ländern eingesetzt, es konnte jedoch trotz bewiesener biochemischer Wirksamkeit die klinische Wirksamkeit in prospektiv randomisierten Studien bisher nicht hinreichend geklärt werden.

Eine der möglichen Gründe hierfür ist neben der Seltenheit der Erkrankung die vermutete Komplexität der Pathogenese. Eine wichtige Rolle wird dem AAT im Proteasen-Antiproteasen Gleichgewicht in der Lunge zugesprochen und es wurde ein antiinflammatorischer Effekt diskutiert. Systemische sowie lokale Effekte und Reaktionen auf die Substitution mit AAT sind bisher nur wenig verstanden. Ebenso wurden im Rahmen der bisher durchgeführten Studien die Wirkungen von AAT abseits des Proteasen-Antiproteasen Verhältnisses und dessen Rolle als akute-Phase-Protein nur wenig bedacht. Es bleibt zu klären warum, obwohl durch die Substitution ausreichende AAT-Spiegel sowohl im Serum als auch im epithelialen Flüssigkeitsfilm der Lunge erreicht werden können, die entzündlichen Prozesse in der Lunge und damit die Progression des Lungenemphysems nicht gestoppt, sondern maximal verlangsamt werden können. Des Weiteren ist zu klären, ob anhand der Entität der immunologischen Reaktionen Aufschluss über die Effekte des AAT bei AATM Patienten erlangt werden kann und welche Rolle die in der Pathogenese als relevant diskutierten Polymere im Zusammenhang mit der Substitutionstherapie spielen.

Auf diesem Hintergrund war der Fokus der Dissertation die Untersuchung des Effekts von substituiertem AAT auf Zytokine und Chemokine in vivo im Serum und EBC bei AATM Patienten, als auch in vitro die Effekte von AAT und seiner Fraktionen, auf die in der Pathogenese des durch AATM bedingten Lungenemphysems relevanten Zellen, zu untersuchen. Die Ziele der Studie waren:

1. Die Inflammationsmarker IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF, MCP-1, VEGF und CRP im Serum, als auch lokale Inflammationsmarker im Atemwegskondensat (EBC) bei Menschen mit einem AAT-Mangel zu bestimmen und deren kurz- und mittelfristige Reaktion auf die Substitution mit AAT zu untersuchen.

Fragestellung

2. Diese Marker bei substituierten und nicht substituierten AATM Patienten zu vergleichen.

3. Effekte der Substitutionstherapie auf die Bildung von Polymeren als ein diskutierter Faktor in der Pathogenese des AATM zu untersuchen.

In vitro des Weiteren:

4. Die immunologische Reaktion von aus an AATM erkrankten Patienten isolierten neutrophilen Granulozyten in Form von Sekretion spezifischer Mediatoren auf die Stimulation mit AAT und seiner Fraktionen zu überprüfen mit dem Ziel, diese unter standardisierten Bedingungen zu evaluieren.

5. Unterschiede in der Reaktion von neutrophilen Granulozyten von AATM Patienten in Form von Sekretion spezifischer Mediatoren vor und nach Substitution mit AAT zu untersuchen.

6. Die Reaktion von primären humanen Bronchialepithelzellen in Form von Ausschüttung spezifischer Mediatoren auf AAT und seine Fraktionen zu untersuchen, um so potentiell toxische Effekte der hochmolekularen Fraktionen des AAT zu evaluieren.

3 Material und Methoden

3.1 Patientencharakteristiken

Tabelle 3 Patientencharakteristiken. Angegeben sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung (m = männlich, w = weiblich, SD = Standardabweichung, FEV₁ = forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde)

	Augmentiert	Nicht augmentiert
Alter	58	53
(SD)	(9,9)	(13,3)
Geschlecht w/m	3 / 9	5 / 7
FEV ₁ in %	44,4	64,8
(SD)	(15,7)	(24,0)
Raucher aktuell/ehemalig	0 / 8	0 / 7
Packyears geraucht	9,7	13,4
(SD)	(7,7)	(16,6)

3.2 Studienteilnehmer

Die Studienpopulation bestand aus 24 AATM Patienten mit durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und isoelektrischer Fokussierung (IEF) nachgewiesenem PiZZ Genotyp. 12 Patienten erhielten eine wöchentliche Substitutionstherapie mit humanem AAT und 12 erhielten keine Substitution mit AAT.

Zum Zeitpunkt der Studie waren alle Teilnehmer Nichtraucher. In der substituierten Gruppe waren 9 ehemalige, in der nicht substituierten Gruppe 7 ehemalige Raucher. Bei allen Teilnehmern wurde einmalig eine Lungenfunktionsuntersuchung mit Hilfe eines Spirometers (Jaeger Cardinal Healthcare, Hoechheim, Deutschland) nach den American Thoracic Society/European Respiratory Society Guidelines (ATS/ERS) durchgeführt, wobei die FEV₁ in der mit AAT behandelten Gruppe im Schnitt 44,4% und in der Kontrollgruppe 64,8% betrug (siehe Tabelle 3).

3.3 Untersuchungsablauf

Bei den substituierten Studienteilnehmern erfolgte die Probengewinnung vor Substitution mit AAT, 2 Stunden nach und 3 Tage nach Substitution mit AAT. Bei der nicht substituierten Gruppe erfolgte die Probengewinnung mindestens einmalig. Um etwaige durch circadiane Rhythmik entstandene Mediatorenschwankungen zu minimieren wurden die Messungen jeweils vormittags durchgeführt.

Alle Patienten beantworteten einen Fragebogen zu aktuellen Symptomen, Rauchstatus, Gesundheitsstatus, aktueller Medikation und Vorerkrankungen (s. Anlage). Hierdurch wurden eine akute Exazerbation und oder die Einnahme oraler Steroide ausgeschlossen. Jeder Studienteilnehmer unterschrieb eine Einverständniserklärung und die Studie ist durch die Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg (Nr. 59/06) bewilligt.

Zudem erfolgte eine Blutentnahme mit Differentialblutbild und Bestimmung von AAT, CRP, PCT, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF. Weiteres Blut wurde zentrifugiert und das im Überstand befindliche Serum abpipettiert, aliquotiert und bei -80 °C zur weiteren Analyse eingefroren. Es erfolgte ein *Multiplex Bead Assay* (Cytometric Bead Array, CBA, BD-Biosciences, San Jose, CA, USA) zur Bestimmung der Konzentrationen von IL-6, VEGF und MCP-1 und ein ELISA zur Bestimmung des hs-CRP und der Polymere.

Die Bestimmung von IL-1beta, IL-6, IL-8, TNF, VEGF and MCP-1 im EBC erfolgte mit Hilfe eines *Multiplex Bead Assays*.

3.4 Methoden

3.4.1 *Exhaled Breath Condensate*

Zur Gewinnung des EBC wurde das RTube (Respiratory Research, Inc., Charlottesville, USA) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein aus Kunststoff gefertigtes Sammelrohr, welches mit Hilfe eines auf -20 °C gekühlten Aluminiumrohres gekühlt wird. Der Patient atmet durch ein Mundstück, welches mit einem Einwegventil versehen ist, damit nur die exhalierte Atemluft in das Sammelrohr gelangt.

Bei der Durchführung wurde gemäß den Richtlinien der American Thoracic Society/European Respiratory Society Task Force on EBC (ATS/ERS) (Horváth et al.

2005) vorgegangen. Entsprechend waren die Probanden angehalten bis mindestens 2 Stunden vor der Messung keine Nahrung zu sich zu nehmen und den Mund vor der Messung mit Leitungswasser auszuspülen. Bei der Messung wurde eine Nasenklammer getragen und die Probanden atmeten ruhig und gleichmäßig für 10 Minuten in das RTube. Zum Schlucken oder Husten waren die Probanden angewiesen die EBC Sammelvorrichtung vom Mund zu nehmen.

Anschließend wurde das EBC mit Hilfe eines Stempels (Respiratory Research, Inc., Charlottesville, USA) an der Spitze des Sammelrohrs gesammelt und mit einer Pipette (Labsystems, Quickborn, Deutschland) in ein LoBind Eppendorfreaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Die Proben wurden nun aliquotiert und bei -80 °C tiefgefroren.

3.4.2 Cytometric Bead Array

Die Messung der Zytokine im EBC als auch im Serum erfolgte durch ein *Multiplex Bead Assay*. Die angegebene Sensitivität beträgt 1,2 pg/ml. Beim Cytometric Bead Array (BDBioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) werden sogenannte „Beads“, d.h. spezifische konjugierte Kügelchen mittels eines FACS Geräts je nach Lichtstreuung differenziert. Es entstehen dreidimensionale Punktwolken, welche in einer Matrix von A1 bis E9 aufgetrennt werden. Hierzu werden zwei Fluorochrome benötigt, das APC und APC-Cy7.

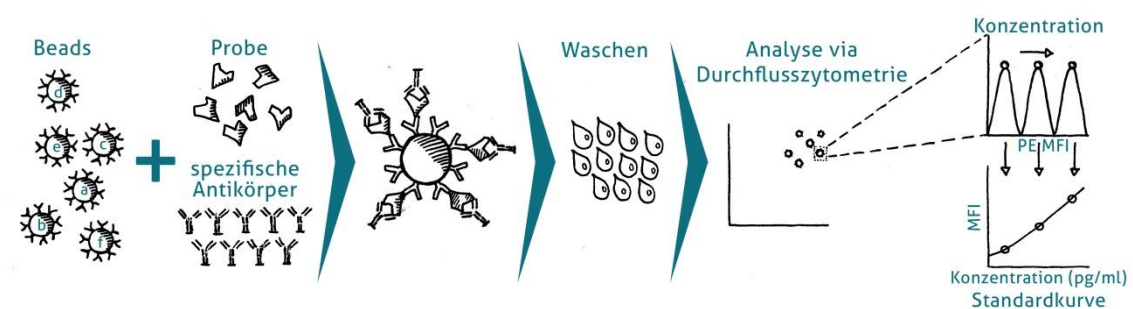


Abbildung 2 Schematische Darstellung des Multiplex Bead Assays⁴. Mit spezifischen Antikörpern konjugierte Kügelchen binden die entsprechenden Proteine. Unter Verwendung eines Durchflusszytometers werden die Kügelchen anhand zweier Fluorochrome in einer Matrix differenziert und schließlich mit einem dritten Farbstoff die Konzentrationen bestimmt.

⁴ Erstellt von Nicolas Ritter

Material und Methoden

Jedes Kügelchen ist mit einer bestimmten Leuchtintensität der beiden Fluorchrome ausgestattet, die es ermöglicht die Punktwolken nach zwei Dimensionen aufzutrennen. Damit kann jede der Punktwolken nun einem der gesuchten Stoffe zugeordnet werden. Ein dritter Farbstoff (PE), welcher mit Hilfe eines Antikörpers an die mit den Kügelchen konjugierten Proteine bindet, schafft die dritte Dimension. Je nach Menge der gebundenen Antikörper entsteht ein von der Konzentration der Analyte abhängiges Leuchtsignal. So können unter Bezug auf eine Standardreihe die Konzentrationen mehrerer Analyte (hier IL-1beta, IL-6, IL-8, TNF, VEGF, MCP-1) in einer Probe erfasst werden.

Zur Durchführung des *Multiplex Bead Assays* wurden zunächst alle Standards der gesuchten Analyte in ein Falconröhrchen gepoolt und mit 4 ml *Assay Diluent* rekonstituiert. Hieraus erfolgte die Erstellung der Standardreihe mit abfallender Konzentration von 2500 pg/ml bis 4 pg/ml. Anschließend wurde die Menge der benötigten „Kügelchen“, „*Mixed Capture Beads*“ und PE-Antikörper, „*Mixed PE Reagents*“ bestimmt und in FACS-Röhrchen zusammengeführt. Die *Mixed Capture Beads* wurden anschließend durch Zugabe von 500 ml Waschpuffer und Zentrifugation bei 200 g gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und der verbliebene Niederschlag entsprechend der Menge der Tests (50 µl pro Test/Probe) mit *Bead Diluent* resuspendiert. Die *Mixed PE Reagents* wurden lediglich mit *PE Reagent Diluent* verdünnt.

Es wurden nun 50 µl der *Mixed Capture Beads* für jede Probe und jeden Standard in ein FACS-Tube vorgelegt. Nach Zugabe von 50 µl der Standardreihe und 50 µl der Proben erfolgte die Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur. Nun wurden in jedes Tube 50 µl der *Mixed PE Reagents* hinzugefügt und weitere 2h lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert.

Zum Waschen wurden jeweils 1 ml Waschpuffer in die Röhrchen gegeben und anschließend bei 200 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes mit einer Pipette (Labsystems, Quickborn, Deutschland) wurde der verbliebene Niederschlag mit 300ml Waschpuffer resuspendiert und gevortext.

Die Messung erfolgte an einem FACS Gerät vom Typ LSRII und der Software FACSDiva 6.0. Die Anzahl der zu messenden Ereignisse wird hierbei nach der Menge der gemessenen Populationen bzw. Proteine bestimmt. Pro Populationen sollten im Schnitt 300 Counts gemessen werden, was in diesem Fall 1500 Counts entspricht. Aus diesen wird für jede Population und Messung die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) des PE bestimmt. Anhand des Vergleiches mit der Standardreihe konnten nun die Konzentrationen bestimmt werden. Die Auswertung erfolgte nach *Debris Gating* mit der Software FCAP Array 2.0.

3.4.3 High Sensitivity/hochsensitives CRP

Die Messung des C-reaktiven Proteins (CRP) im EBC erfolgte unter Verwendung eines kommerzielles ELISA Kits der Firma Salimetrics (Salimetrics LLC, State College, PA, USA) verwendet. Die Sensitivität ist mit 10 pg/ml angegeben. Für die Erstellung der Standardreihe wurde zunächst eine Verdünnungsreihe von 3000 pg/ml bis 93,75 pg/ml erstellt. Nun wurden jeweils 50µl der Standards, EBC Proben und CRP Assay Diluent, welches als Nullwert diente, auf die Multiwellplatte aufgetragen. Die Multiwellplatte war mit einem primären Maus-Antikörper gegen humanes CRP beschichtet. Es erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung. Anschließend wurden 150µl eines für humanes CRP spezifischen mit Meerrettichperoxidase konjugierten sekundären Ziegen-Antikörpers hinzugegeben und für 2 Stunden auf einem Horizontalschüttler (Typ ST5, Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH, Staufen, Deutschland) inkubiert. Es erfolgte ein Waschgang mit viermaliger Aspiration. Die Verifizierung des gebundenen Antikörpers erfolgte nach dreimaligem Waschen mit der indirekten Peroxidase-Methode. Hierzu wurde als Substrat 200µl TMB hinzugegeben und nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten die Reaktion mit 50µl H₂SO₄ gestoppt. Die Absorption wurde mit einem Tecan Ultra 384 Reader (Tecan, Crailsheim, Deutschland) bei 450 nm gemessen.

Die Messung des CRP im Serum erfolgte mit Hilfe eines kommerzielles ELISA Kits der Firma R&D Systems (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA). Die Sensitivität ist mit 0,010 ng/ml angegeben. Die Serumproben wurden 100 fach verdünnt, hierfür wurden 10µl Serum mit 990µl Calibrator Diluent RD5P verdünnt. Es erfolgte die Erstellung einer Standardreihe von 50 ng/ml bis 0,78 ng/ml. Nun wurde 100µl Assay Diluent RD1F und anschließend jeweils 50 µl von Standards und Proben auf die Multiwellplatte

aufgetragen. Calibrator Diluent RD5P diente hierbei als Nullwert. Die Multiwellplatte war mit einem primären Maus-Antikörper gegen humanes CRP beschichtet. Es erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung. Anschließend wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte ein Waschgang mit viermaliger Aspiration. Nun wurden 200µl eines für humanes CRP spezifischen mit Merretichperoxidase konjugierten sekundären Maus-Antikörpers hinzugegeben und erneut für 2 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschgang mit viermaliger Aspiration. Die Menge des gebundenen Antikörpers wurde nach dreimaligem Waschen mit der indirekten Peroxidase-Methode unter Verwendung von 200µl TMB als Substrat verifiziert. Anschließend erfolgte die lichtgeschützte Inkubation für 30 Minuten. Zum Stoppen der Reaktion wurden 50µl H₂SO₄ auf die Multiwellplatte gegeben. Die Absorption wurde mit einem Tecan Infinite f200pro (Tecan, Crailsheim, Deutschland) bei 450 nm gemessen.

3.4.4 Polymer ELISA

Die Durchführung des ELISA zum Nachweis von Polymeren im Serum erfolgte durch Juan Perez, Department of Medicine, University of Cambridge, Cambridge Institute for Medical Research, Cambridge, UK. Der hierfür verwendete Anti-α1-Antikörper (mAbs) wurde durch die Immunisierung von Mäusen mit Z-Polymeren von Pi-Z homozygoten AATM Patienten gewonnen (Miranda et al. 2010). Es wurden 100 µl Serum jeder Probe aliquotiert und auf Trockeneis verschickt. Die Verblindung der Proben erfolgte mittels einer Schlüsselliste. Die entblindeten Proben wurden entsprechend der statistischen Angaben (s.u.) ausgewertet. Aufgrund eines Mangels an Probe konnten die Polymerkonzentrationen nur bei der substituierten Studiengruppe bestimmt werden.

3.4.5 Zellversuche

Für die Stimulation der Zellen mit den verschiedenen AAT-Fractionen erfolgte die Auftrennung von Prolastin™ (Grifols Biotherapeutics, Spanien) in hoch- und niedrigmolekulare Fraktionen. Zur Gewinnung der niedrigmolekularen Fraktion wurde Prolastin™ in 40 ml der zugehörigen Infusionslösung auf eine Konzentration von 25 mg/ml gelöst. Zur vollständigen Lösung erfolgte die 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Roller. Nun wurden 30 ml der erstellten Lösung mit 30 ml PBS verdünnt (Konzentration = 12,5 mg/ml) und in zwei 100 kDa Micropore-Säulen

(Amicon Ultra, Millipore Ireland, Cork, Irland) gegeben. Nach Zentrifugation bei 4000 rpm (Hettich Roticon 380, DJB Labcare Ltd, Buckinghamshire, England) für 45 Minuten wurde das Konzentrat, welches die hochmolekularen Anteile enthielt, abpipettiert, zur Stabilisierung der Polymere auf 60°C für 3 Stunden erhitzt und anschließend in Eppendorfreaktionsgefäße übertragen. Nach Auftragung des Filtrats auf zwei weitere 30 kDa Micropore Säulen erfolgte die Zentrifugation bei 4000 rpm für 45 Minuten. Hierauf erfolgte die Aliquotierung in Eppendorfreaktionsgefäße.

Neutrophile Granulozyten

Die Isolation der Neutrophilen Granulozyten von PiZZ AATM Patienten vor und nach Infusion mit Prolastin™ aus dem peripheren Blut erfolgte mit Hilfe eines Dichtegradienten (Polymorphprep, Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norwegen). Hierfür wurden 12,5 ml Polymorphprep in ein 50 ml Falconröhrchen (BDBioscience, Franklin Lakes, New Jersey, USA) gegeben und mit 20 ml heparinisiertem Blut überschichtet. Nach Zentrifugation (Hettich Roticon 380, DJB Labcare Ltd, Buckinghamshire, England) bei 490 g für 35 Minuten bei Raumtemperatur wurde die oberste Schicht verworfen. Die nächste Schicht, welche die neutrophilen Granulozyten enthält, wurde in ein weiteres 50 ml Falconröhrchen übertragen und mit PBS aufgefüllt. Es erfolgte die erneute Zentrifugation für 10 Minuten. Durch Zugabe von 14 ml 0,2 % w/v NaCl für 20 Sekunden erfolgte die Lyse der verbliebenen Erythrozyten (Labsystems, Quickborn, Deutschland). Danach wurden weitere 14 ml 1,6 % w/v NaCl hinzugefügt und das Falconröhrchen mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Dieser Waschvorgang erfolgte 2x. Die Reinheit und Lebensfähigkeit in der Trypanblau-Färbung betrug über 95 %. Die Resuspendierung der isolierten neutrophilen Granulozyten (1×10^6 Zellen/ml) erfolgte in durch mit 10 % w/v Kälberserum und 1 % w/v Penicillin/Streptomycin (FCS) (alles PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) ergänztem RPMI. Danach erfolgte die Stimulation mit 1 mg/ml Monomer, Polymer oder Prolastin™ oder 0,1 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS) und die Inkubation bei 37°C und 5% v/v CO₂ für drei Stunden. Die Messungen der IL-8 Konzentrationen in den Zellüberständen erfolgte via ELISA (R&D Systems, UK).

Primäre humane Bronchialepithelzellen

Primäre humane Bronchialepithelzellen (PHBEC) (Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) wurden in *Air Liquid Interface* (ALI) Kultursystemen kultiviert. Hierfür wurden ALI Transwell-Platten (Corning Costar 3460 Clear transwell, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) zunächst kollagenisiert und anschließend mit 250 µl Medium (Airway Epithelial Cell Growth medium, Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) vorinkubiert. Zur Aufbereitung der PHEBCs wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen (T-75CN Vent Cap Rad, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) entfernt und die Flaschen mit 10 ml PBS gewaschen, um die abgestorbenen Zellen zu entfernen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 ml angewärmte Trypsin/EDTA Lösung (PAA, Pasching, Österreich) und die erneute Inkubation bei 37 °C und 5% v/v CO₂ für 3-15 min, bis sich die Zellen lösen. Zur Inaktivierung der Trypsin/EDTA Lösung wurde nun 10% w/v inaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) hinzugegeben. Nach Zusammenführen der Zellen in einem 50 ml Falconröhrchen erfolgte die Zellzählung in der Neubauer Zählkammer. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 rpm bei 20°C für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und in Medium auf die gewünschte Konzentration von 250.000 Zellen/500 µl resuspendiert. Die Zellen wurden nun auf die apikale Seite der semipermeablen Membran (250.000 Zellen / Well), und 1 ml Medium auf die basale Seite der Membran gegeben. Nun erfolgte für 10 Tage alle 2 Tage ein Mediumwechsel, bis sich eine Monolayer-Kultur ausgebildet hat. Sobald sich diese ausgebildet hatte, wurde das apikale Medium entfernt und dadurch ein *Air-Liquid Interface* Kultursystem ausgebildet. Zur vollständigen Differenzierung benötigten die ALI-Kulturen eine Aufrechterhaltung für 6 Wochen. Hierbei wurde zur Promotion der Zelldifferenzierung beim Mediumwechsel 0,1 ng Retinsäure hinzugefügt. Nach vollständiger Differenzierung erfolgte die Stimulation von basal mit 1 mg/ml Prolastin™ bzw. den verschiedenen Fraktionen des Prolastin™, 0,1 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS), 0,1 µg/ml TNF und 0,1 µg/ml IL-8 für 4 bzw. 24 Stunden. Die Messungen der Zytokine IL-6, IL-8 und MCP-1 erfolgten aus den Zellkulturüberständen via ELISA (R&D Systems, UK).

3.4.8 Statistik

Die Daten wurden mit Hilfe der Graphpad 5.0 Software analysiert. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert \pm SD. Der Test auf Normalverteilung erfolgte unter Verwendung des D'Agostino & Pearson omnibus normality test. War diese gegeben, so wurde bei

Material und Methoden

gepaarten Proben ein gepaarter t-test und bei ungepaarten Proben der Students t-test durchgeführt. Bei nicht gegebener Normalverteilung wurde der Wilcoxon Matched-Pairs Signed Rank Test, respektive der Mann-Whitney Test angewandt. Ergebnisse mit $p < 0,05$ sind als statistisch signifikant bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 In vivo

4.1.1 AAT Konzentrationen

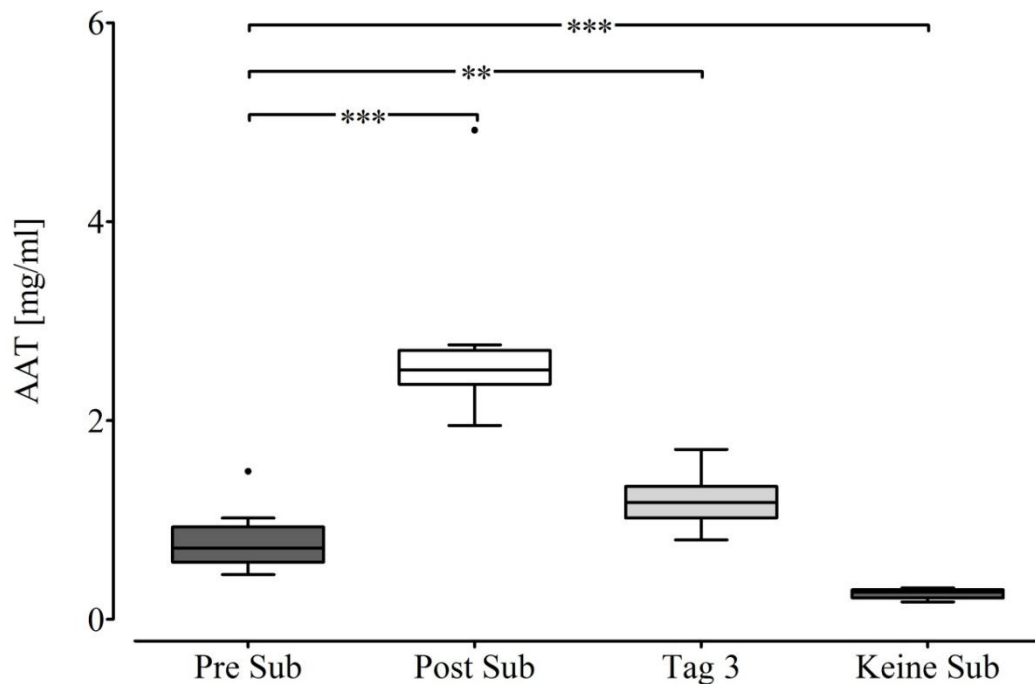


Abbildung 3 Grafische Darstellung der AAT Konzentrationen im Serum. Die AAT Konzentrationen im Serum steigen nach Substitution von AAT signifikant an. Substituierte AATM Patienten haben zu jedem Messzeitpunkt signifikant höhere AAT Konzentrationen im Serum als nicht substituierte AATM Patienten (Pre Sub = vor Substitution mit AAT, Post Sub = 2 Stunden nach Substitution mit AAT, Tag 3 = Tag 3 nach Substitution mit AAT, Keine Sub = nicht substituierte Patienten; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$)

Zur Bestimmung des Einflusses der AAT-Substitution auf die AAT-Konzentrationen im Serum wurden diese bei substituierten AATM Patienten vor Substitution mit AAT, 2 Stunden danach und an Tag 3 nach Substitution und bei nicht substituierten AATM Patienten bestimmt.

Bei den Messungen der substituierten Patienten ($n = 12$) vor Substitution fand sich eine mittlere AAT-Konzentration von 0,7781 g/l (SD = 0,2818), zwei Stunden nach Infusion eine mittlere AAT-Konzentration von 2,678 g/l (SD = 0,7393) und an Tag 3 nach Infusion mit AAT eine mittlere AAT-Konzentration von 1,193 g/l (SD = 0,2403). Bei den nicht substituierten Studienteilnehmern ($n = 12$) wurde eine mittlere AAT-

Ergebnisse

Konzentration von 0,2593 (SD = 0,04623) gemessen. Die AAT Konzentrationen nach Substitution sind signifikant höher als vor Substitution ($p < 0,0001$) und fallen signifikant an Tag 3 ($p < 0,0001$), sind jedoch immer noch signifikant höher als vor der Substitution ($p < 0,0014$). Serumkonzentrationen in nicht substituierten AATM Patienten sind im Vergleich zu substituierten Patienten vor, nach und an Tag 3 der Substitution mit AAT erniedrigt ($p < 0.0001$).

Die AAT-Substitution führt zu einem Anstieg der Serumkonzentrationen unmittelbar nach Substitution und hält die AAT-Serumkonzentrationen über einen Wochenzyklus über den bei nicht substituierten Patienten gemessenen AAT-Konzentrationen.

4.1.2 AAT Polymer Konzentrationen

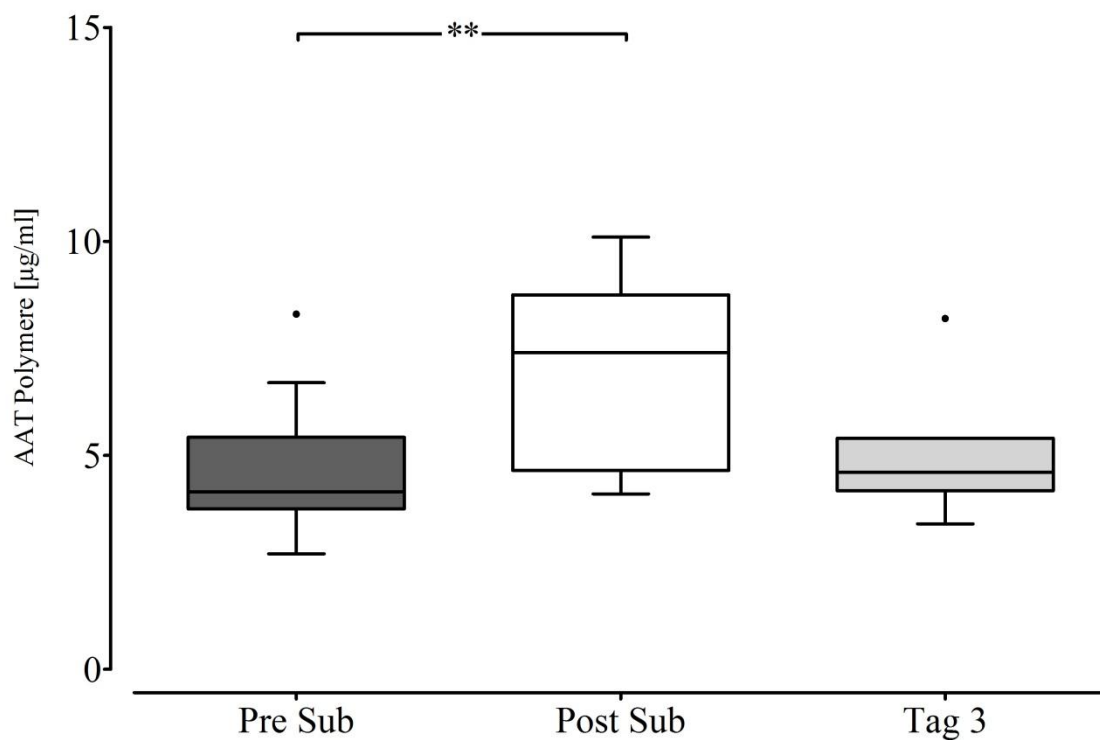


Abbildung 4 Grafische Darstellung der AAT-Polymer Konzentrationen im Serum. Die AAT-Polymer Konzentrationen steigen unmittelbar nach Substitution von AAT signifikant an (Pre Sub = vor Substitution mit AAT, Post Sub = 2 Stunden nach Substitution mit AAT, Tag 3 = Tag 3 nach Substitution mit AAT, Keine Sub = nicht substituierte Patienten; $**p < 0,01$)

Ergebnisse

Durch Bestimmung der Polymerkonzentrationen im Serum bei substituierten Patienten vor Substitution mit AAT, 2 Stunden danach und an Tag 3 nach Substitution wurde der Einfluss der Substitutionstherapie auf die Konzentrationen der Polymere im Serum untersucht.

In der substituierten Gruppe ($n = 10$) wurden im Serum die AAT-Polymerkonzentrationen bestimmt. Hierbei wurde vor Substitution eine mittlere Polymerkonzentration von $4,740 \mu\text{g/ml}$ ($SD = 1,635$), nach Substitution von $6,940 \mu\text{g/ml}$ ($SD = 2,219$) und an Tag 3 eine mittlere Konzentration von $4,980 \mu\text{g/ml}$ ($SD = 1,305$) gemessen. Der Vergleich der Konzentrationen der AAT-Polymere zeigt einen signifikanten Unterschied vor und nach Substitution ($p = 0,0024$). An Tag 3 erreichen die gefundenen Konzentrationen wieder das Niveau des Ausgangswerts ($p = 0,1525$).

Es ist zu beobachten, dass es im Rahmen der Substitutionstherapie unmittelbar nach Substitution zu einem Anstieg der AAT-Polymerkonzentrationen im Serum kommt. Die Serumkonzentration des AAT korrelieren mit denen der AAT Polymere ($r = 0,55$, $p = 0,0017$).

4.1.3 Biomarker im Serum

Die Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF α , MCP-1 und VEGF wurden im Serum der substituierten Patienten zu den verschiedenen Zeitpunkten und bei den nicht substituierten AATM Patienten bestimmt.

Tabelle 4 Die Zytokinkonzentrationen im Serum bei augmentierten AATM Patienten im Verlauf einer Woche. Die Zytokinmessung erfolgte bei den augmentierten Patienten vor der Substitution mit AAT, 2 Stunden nach und an Tag 3 des wöchentlichen Substitutionszyklus. Angaben in pg/ml (SD = Standardabweichung, NS = nicht signifikant).

Analyt	Pre		Post		P-Wert	Tag 3		P-Wert
	Mittelwert (SD)		Mittelwert (SD)		Pre vs Post	Mittelwert (SD)		Pre vs Tag 3
IL-8	4,26	(3,9)	6,5	(3,5)	0,0324	7,92	(3,3)	0,0211
MCP-1	85,1	(65,1)	67,0	(55,8)	0,074	40,2	(22,3)	0,035
IL-6	1,58	(1,78)	0,42	(0,99)	0,012	1,17	(1,85)	NS
TNFα	9,51	(2,6)	9,86	(2,9)	NS	11,7	(2,6)	0,030
VEGF	35,3	(38,8)	15,4	(16,3)	0,023	20,0	(34,4)	NS

Bei den substituierten AATM Patienten fand sich vor Substitution eine mittlere Interleukin-8 Konzentration von 4,258 pg/ml (SD = 3,903), zwei Stunden nach Infusion war die mittlere IL-8 Konzentration bei 6,492 pg/ml (SD = 3,493) und stieg an Tag 3 auf 7,917 pg/ml (SD = 3,285). IL-8 Konzentrationen sind an Tag 3 signifikant höher als vor der Substitution von AAT ($p = 0,0211$).

Die mittlere Konzentration von MCP-1 betrug vor Substitution 85,08 pg/ml (SD = 65,09), zwei Stunden nach Substitution 67,00 pg/ml (SD = 55,80) und an Tag 3 nach Substitution 40,17 pg/ml (SD = 22,33). Es kommt zu einem Abfall der Konzentration nach Substitution ($p = 0,0743$) und einem weiteren signifikanten Abfall an Tag 3 im Vergleich zu vor der Substitution von AAT ($p = 0,035$).

Die gemessene mittlere Konzentration für Interleukin-6 betrug vor der Substitution 1,583 pg/ml (SD = 1,782), 2 Stunden nach Substitution 0,4167 pg/ml (SD = 0,9962) und

Ergebnisse

an Tag 3 nach Substitution 1,167 pg/ml (SD = 1,850). IL-6 Konzentrationen im Serum sind nach Substitution signifikant niedriger als vor Substitution von AAT ($p = 0,012$).

Für TNF α konnten vor Substitution von AAT eine mittlere Konzentration von 9.508 pg/ml (SD=2.557), nach Substitution 9,858 pg/ml (SD = 2,911) und an Tag 3 nach Substitution von AAT von 11,73 (SD = 2,619) beobachtet werden. TNF α zeigt keine unmittelbare Reaktion auf die Substitution, steigt jedoch an Tag 3 nach Substitution signifikant an ($p = 0,030$).

Für VEGF wurden vor Substitution von AAT eine mittlere Konzentration von 35,25 pg/ml (SD = 38,87), nach Substitution von AAT 15,42 pg/ml (SD = 16,25) und an Tag 3 nach Substitution mit AAT von 20,00 pg/ml (SD = 34,44) gemessen. Auch hier sind die Konzentrationen unmittelbar nach Substitution von AAT signifikant niedriger ($p = 0,023$).

Tabelle 5 Die Zytokinkonzentrationen im Serum der augmentierten Patienten im Vergleich mit den nicht augmentierten Patienten. Es erfolgte die Messung der Zytokine IL-8, MCP-1, IL-6, TNF α und VEGF im Serum. Der für die augmentierten Patienten angegebene Wert ist jeweils vor Substitution (Tag 7 nach Substitution) gemessen. Angaben in pg/ml. (A = augmentierte Patienten, N = nicht augmentierte Patienten; n = Anzahl; SD = Standardabweichung, NS = nicht signifikant).

Analyt	Patient, n	Augmentiert (A)		Nicht augmentiert (N)		A vs N
	A-N	Mittelwert (SD)		Mittelwert (SD)		P-Wert
IL-8	12-12	4,26	(3,9)	8,4	(4,2)	0,02
MCP-1	12-11	85,01	(65,1)	39,9	(23,6)	0,029
IL-6	12-11	1,58	(1,8)	1,45	(3,3)	NS
TNF α	12-12	9,5	(2,6)	11,4	(2,4)	NS
VEGF	12-11	35,3	(38,9)	30,0	(57,7)	NS

Ergebnisse

Die gemessene mittlere IL-8 Konzentration in der nicht substituierten Gruppe betrug 8,433 pg/ml (SD = 4,214). Bei den nicht substituierten AATM Patienten finden sich signifikant höhere IL-8 Werte als bei den Substituierten vor Substitution ($p = 0,0196$).

Die mittlere MCP-1 Konzentration betrug 39,91 pg/ml (SD = 23,98). Die gemessene mittlere MCP-1 Konzentration der substituierten Gruppe ist signifikant höher als die der nicht substituierten Gruppe ($p = 0,0288$).

Bei nicht substituierten AATM Patienten zeigte sich eine mittlere VEGF Konzentration von 30,00 pg/ml (SD = 57,67) und eine mittlere IL-6 Konzentration von 1,455 pg/ml (SD = 3,328). Die gemessenen VEGF als auch die IL-6 Konzentrationen unterschieden sich nicht signifikant von den substituierten AATM Patienten.

Bei dieser Gruppe betrugen die mittleren TNF Konzentrationen 11,41 pg/ml (SD = 2,426). Die Werte bei den nicht substituierten Patienten sind höher als bei den substituierten Studienteilnehmern vor Substitution, jedoch nicht signifikant ($p = 0,0752$).

IL-1 β konnte in keiner der Proben nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der Zytokinkonzentrationen im Serum zeigt eine Veränderung der Konzentrationen als Reaktion auf die Substitution mit AAT im besonderen Maße bei IL-8 und MCP-1, aber auch von TNF, IL-6 und VEGF. Zudem zeigen sich höhere IL-8 und niedrigere MCP-1 Spiegel bei nicht substituierten AATM Patienten.

Zur Evaluierung der unspezifischen Entzündung und zur Korrelation der Serumwerte mit den gefundenen Werten im EBC wurde bei substituierten und nicht substituierten Studienteilnehmern zudem die hsCRP Konzentration im Serum bestimmt. Die hierbei gemessene mittlere Konzentration betrug vor Substitution 3168 ng/ml (SD = 2706), nach Substitution 2761 ng/ml (SD = 2940), an Tag 3 2294 ng/ml (SD = 2741) und im Serum der nicht substituierten Probanden 2917 ng/ml (SD = 2895). Im Serum waren keine signifikanten Unterschiede im Verlauf der Woche als auch zwischen den Untersuchungsgruppen festzustellen.

4.1.4 Biomarker im EBC

Zur Evaluation der lokalen Effekte der Substitutionstherapie wurden die verschiedenen Biomarker im EBC bestimmt.

Keines der Zytokine IL-1beta, IL-6, IL-8, TNF, MCP-1 und VEGF konnte in der EBC CBA Analyse nachgewiesen werden.

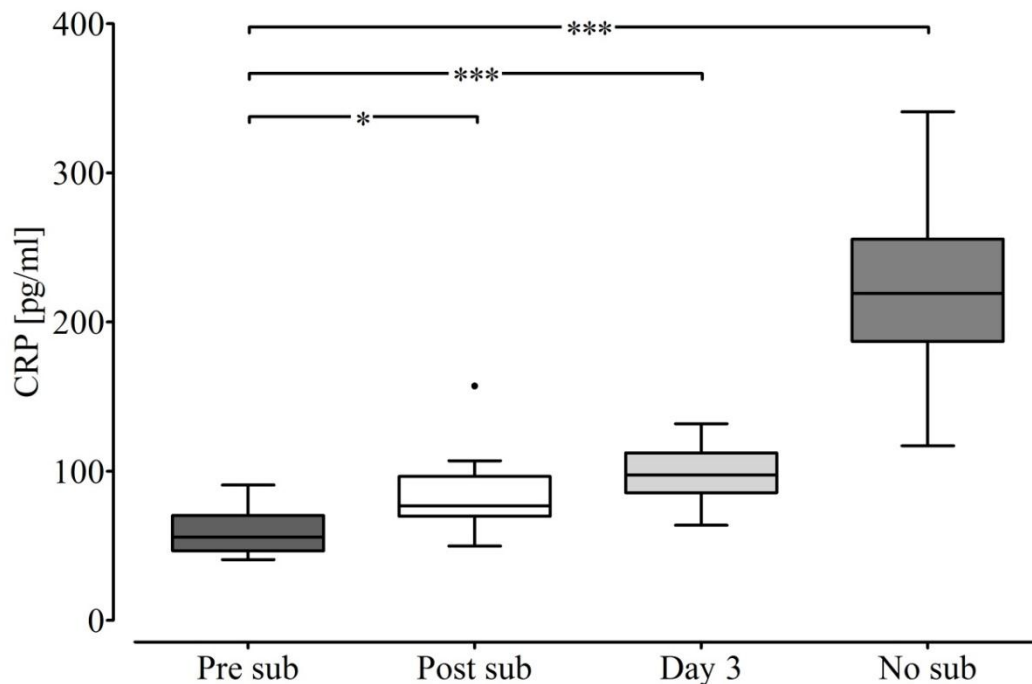


Abbildung 5 Grafische Darstellung der CRP Konzentrationen im EBC. Nicht substituierte AATM Patienten haben signifikant höhere CRP Konzentrationen im EBC. Die CRP Konzentrationen im EBC der substituierten AATM Patienten steigen nach Substitution und an Tag 3 signifikant (* $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$).

Als ein weiterer unspezifischer Marker für entzündliche Prozesse wurde CRP im Atemwegskondensat bestimmt. Die hierbei gemessene mittlere Konzentration betrug vor Substitution 59,53 pg/ml (SD = 16,59), nach Substitution 84,84 pg/ml (SD = 27,23) und an Tag 3 98,39 pg/ml (SD = 19,42). Die nicht substituierte Gruppe zeigte mit einer mittleren Konzentration von 220,2 pg/ml (SD = 57,38) deutlich höhere Werte. CRP im EBC steigt nach Substitution signifikant an ($p = 0,0117$) und weiter an Tag 3 nach Substitution ($p < 0,0001$). Die CRP Konzentrationen sind bei nicht substituierten AATM Patienten signifikant höher als vor, nach und an Tag 3 der Substitutionstherapie ($p < 0,0001$).

Ergebnisse

Der Vergleich zeigt, dass CRP Konzentrationen im Atemwegskondensat bei nicht substituierten AATM Patienten deutlich höher sind als bei substituierten AATM Patienten. Zudem kommt es zu einem leichten Anstieg des CRP im EBC im Verlauf der Woche bei den substituierten AATM Patienten.

4.2 In vitro

4.2.1 Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit AAT

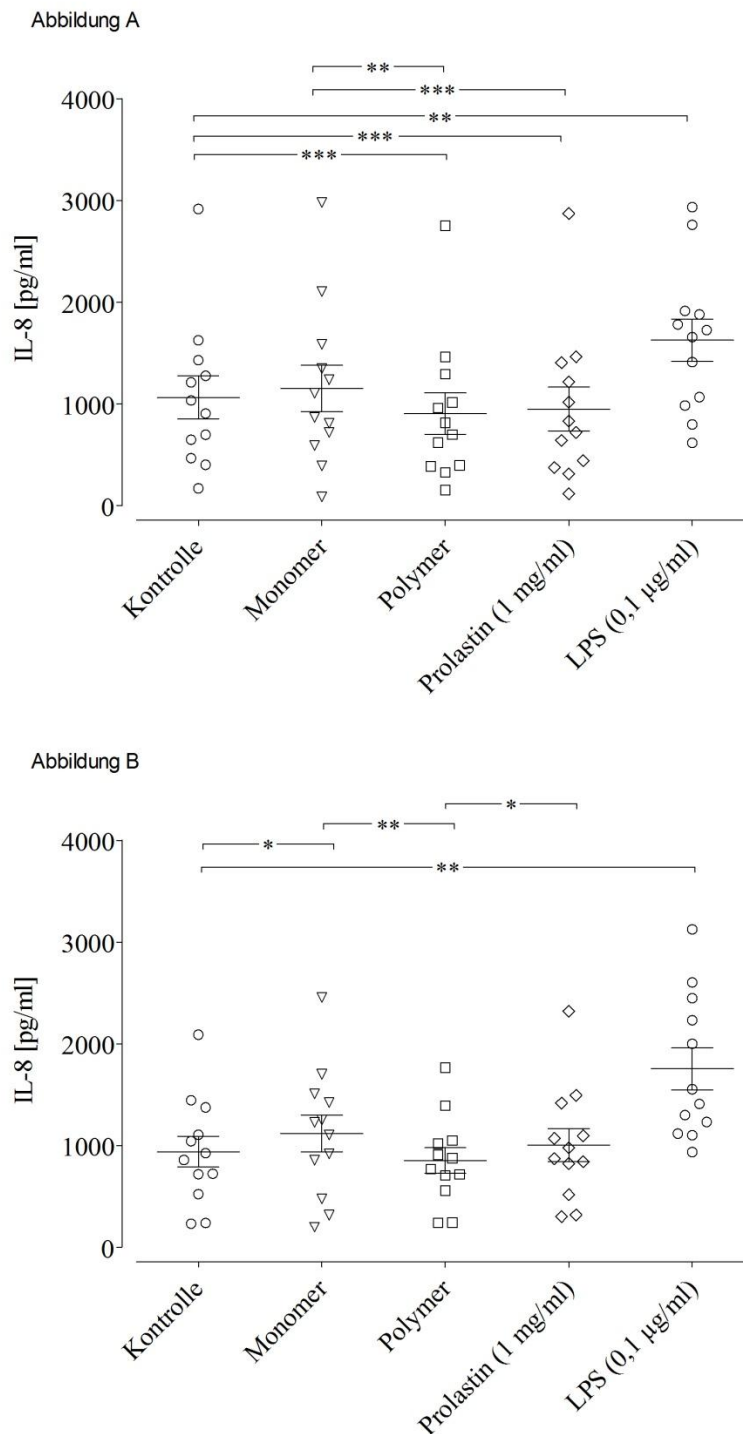


Abbildung 6 Die Effekte des Prolastin™ und seiner verschiedenen Fraktionen auf die IL-8 Sekretion von neutrophilen Granulozyten isoliert aus PiZ homozygoten Spendern. Vor Substitution von AAT (Abb. A) ist die IL-8 Konzentration nach Stimulation mit Prolastin™ und Polymer signifikant niedriger als bei der Kontrolle. Nach Stimulation mit Monomer ist die IL-8 Konzentration höher als bei der Kontrolle und als nach Stimulation mit Polymer und

Ergebnisse

Prolastin™. Nach Substitution von AAT (Abb. B) ist nach Stimulation mit Monomer die IL-8 Konzentration signifikant höher als bei der Kontrolle. Die IL-8 Konzentrationen nach Stimulation mit Prolastin™ und Polymer zeigen nach Substitution keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$).

Die Funktionen des AAT abseits des Proteasen-Antiproteasen Verhältnisses sollten durch die Bestimmung der Reaktion von neutrophilen Granulozyten auf die pharmakologische Darreichungsform Prolastin™ und dessen verschiedene Fraktionen untersucht werden. Hierfür wurden neutrophile Granulozyten von PiZ-homozygoten substituierten AATM Patienten (n = 12) jeweils vor und zwei Stunden nach der wöchentlichen Infusion mit AAT isoliert.

Nach Stimulation mit PBS wurde eine mittlere Konzentration von 1065 pg/ml (SD = 730,7), bei der Stimulation mit Monomeren entsprechend 1152 pg/ml (SD = 792), den Polymeren 906 pg/ml (SD = 703,8) und Prolastin™ von 951,5 pg/ml (SD = 744,0) gemessen. Die höchsten Werte wurden mit 1627 pg/ml (SD = 717) nach Stimulation mit LPS gemessen. Es zeigten sich signifikant niedrigere IL-8 Werte bei Stimulation mit Polymer im Vergleich zu Monomer ($p = 0,0024$). Ebenso waren die Werte nach Stimulation mit Prolastin™ signifikant niedriger als bei Stimulation mit Monomer ($p = 0,0010$). Signifikant höhere Werte zeigten sich bei LPS im Vergleich zur Negativkontrolle ($p = 0,0024$).

Bei der entsprechenden Messung 2 Stunden nach Substitution zeigten sich nach Stimulation mit PBS mittlere IL-8 Konzentrationen von 938,8 pg/ml (SD = 528,8), bei monomerischem AAT von 1119 pg/ml (SD = 633,2), bei den Polymeren 852,4 pg/ml (SD = 434,1) und beim Prolastin™ 1003 pg/ml (SD = 559,0). Es wurden nach Stimulation mit LPS mit 1754 pg/ml (SD = 708,0) die höchsten IL-8 Konzentrationen gemessen. Signifikant höhere Konzentrationen zeigten sich bei Stimulation mit monomerischem AAT im Vergleich zur Negativkontrolle ($p = 0,0253$) und zu polymerischem AAT ($p = 0,0030$). Die gemessenen Werte waren nach Stimulation mit Prolastin™ signifikant höher als nach Stimulation mit AAT-Polymeren ($p = 0,0163$). Auch nach Substitutionstherapie zeigten sich nach Stimulation mit LPS signifikant höhere Werte als bei PBS ($p = 0,0010$). Nach Substitution sind keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen der Kontrolle und Prolastin™ nachzuweisen ($p = 0,1991$).

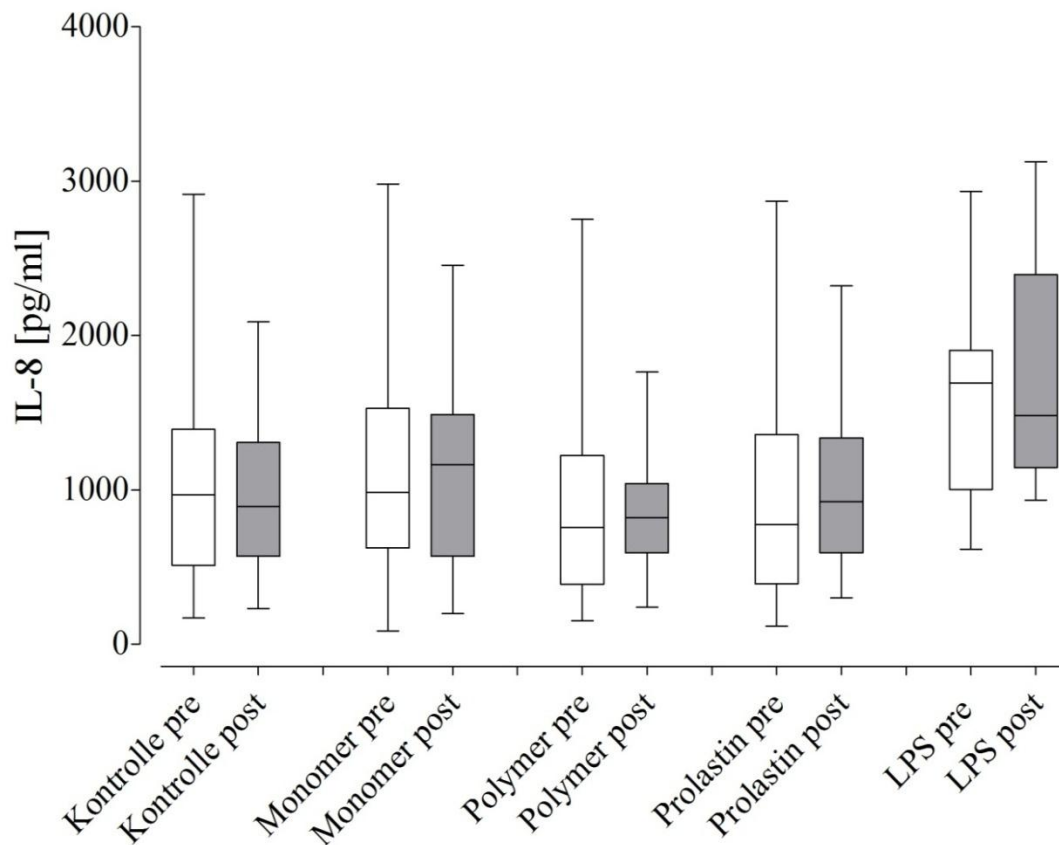


Abbildung 7 Die Effekte des Prolastin™ und seiner verschiedenen Fraktionen auf die IL-8 Sekretion von neutrophilen Granulozyten vor und nach Substitution. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der IL-8 Konzentrationen vor und nach Substitution.

Im Vergleich der IL-8 Konzentrationen bei vor und nach Substitution mit AAT isolierten Granulozyten bestehen keine signifikanten Unterschiede. Die mittleren Konzentrationen betragen für die Kontrollen vor Substitution im Mittel 1065 pg/ml (SD = 730,7) und nach Substitution mit AAT 938,8 pg/ml (SD = 528,8), für die Monomere wurden Werte von 1152 pg/ml (SD = 792,4) bzw. 1119 pg/ml (SD = 633,2) gemessen, für die Polymere 906 pg/ml (SD = 703,8) und 852,4 pg/ml (SD = 434,1) und bei Stimulation mit Prolastin™ 951,5 pg/ml (SD = 744) und 1003 pg/ml (SD = 559,0). Nach Stimulation mit LPS steigt der Mittelwert von IL-8 bei den von den Patienten nach Substitution mit AAT gewonnenen Granulozyten von 1627 pg/ml (SD = 717,0) auf 1754 pg/ml (SD = 708).

Es zeigen sich bei der Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit Prolastin™ und AAT-Polymeren niedrigere IL-8 Konzentrationen als nach Stimulation mit AAT-

Ergebnisse

Monomeren. Die gemessenen IL-8 Konzentrationen nach Stimulation mit Monomer sind signifikant höher als die der Kontrolle. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der IL-8 Sekretion der neutrophilen Granulozyten vor und nach Substitution festgestellt werden.

Abbildung A

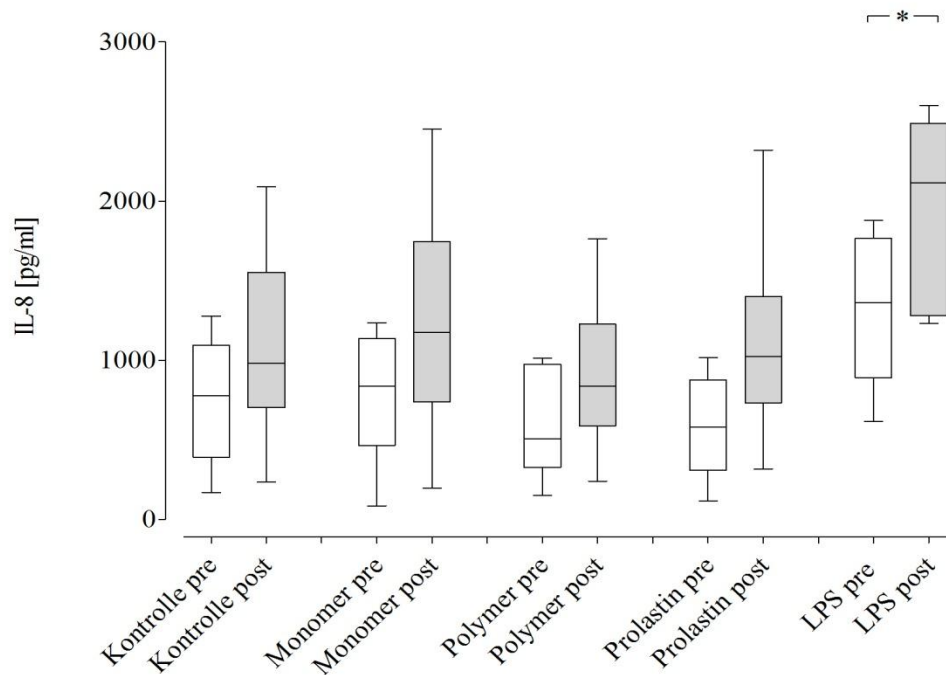


Abbildung B

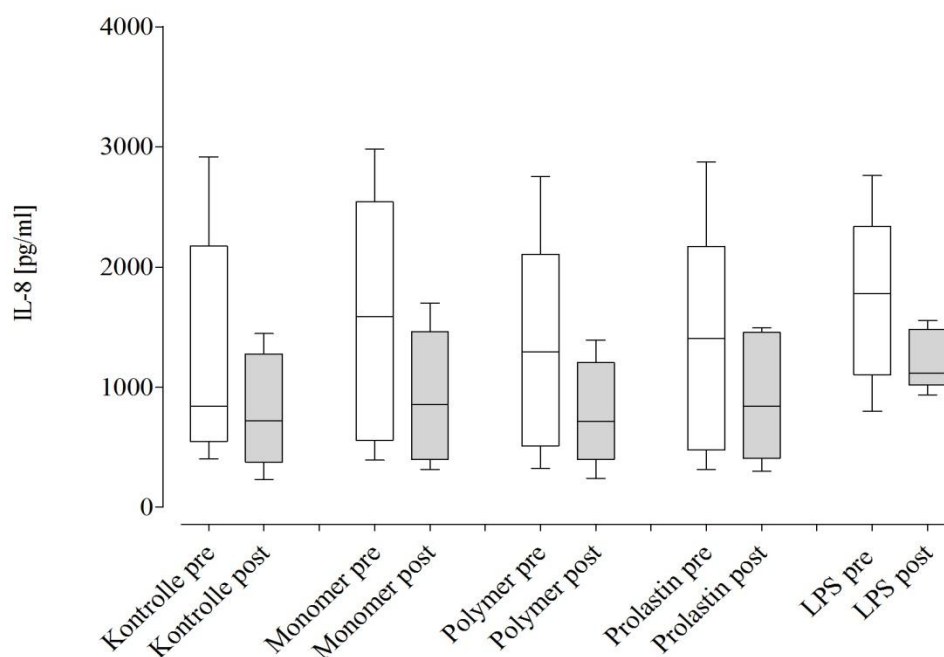


Abbildung 8 Subgruppenanalyse der Reaktion neutrophiler Granulozyten auf die Stimulation mit Prolastin™ und seiner Fraktionen. Es kann in zwei Subpopulationen, in positive Responder (n=6)(Abb. A) und negative Responder (n=5) (Abb. B) eingeteilt werden. Hierbei reagieren die positiven Responder auf alle Stimuli nach Substitution mit einem deutlichen Anstieg der IL-8 Sekretion der NG, die negativen Responder mit einer Verminderung der IL-8 Sekretion. Besonders deutlich ist dieser Effekt bei Betrachtung der Reaktion auf LPS ($p = 0,0155$).

4.2.2 Stimulation von primären humanen Lungenepithelzellen mit AAT

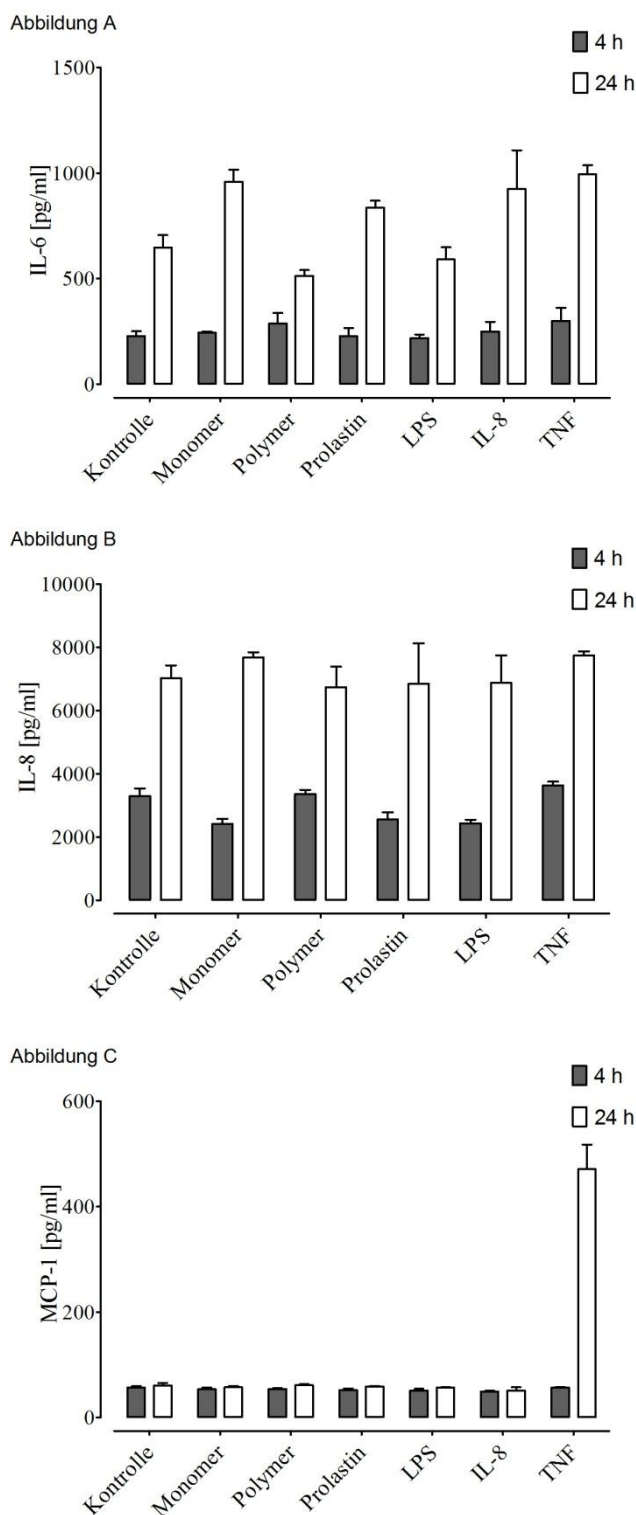


Abbildung 9 Die Effekte des Prolastin™ und seiner verschiedenen Fraktionen auf primäre humane Bronchialepithelzellen. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den IL-6, IL-8 und MCP-1 Konzentrationen zwischen den verschiedenen Stimuli. Die IL-6 (Abb. A) und IL-8 (Abb. B) Konzentrationen steigen nach 24h bei allen Stimuli an. Die MCP-1 (Abb. C) Konzentration zeigt nach Stimulation der Zellen mit TNF einen deutlichen Anstieg bei Messung nach 24h.

Ergebnisse

Zur Untersuchung der Effekte des Prolastin™ und seiner Fraktionen auf das Lungenepithel wurden primäre humane Bronchialepithelzellen in vitro mit den verschiedenen Formen des AAT stimuliert und die IL-8, IL-6 und MCP-1 Konzentrationen jeweils nach 4 und 24 Stunden bestimmt.

Die IL-8 Konzentrationen betrugen im Überstand in der Kontrolle nach 4h 3298,7 pg/ml (SD = 241,9) und nach 24h 7015,8 pg/ml (SD = 412,1). Nach Stimulation mit AAT Monomeren nach 4h 2419,3 pg/ml (SD = 156,6) und nach 24h 7674,6 pg/ml (SD = 168,4). Nach Stimulation mit AAT Polymeren betrugen die IL-8 Konzentrationen nach 4h 3359,1 pg/ml (SD = 130,8), nach 24h 6734,2 pg/ml (SD = 649,3), mit Prolastin™ nach 4h 2551,5 pg/ml (SD = 227), nach 24h 6850,7 pg/ml (SD = 1274,7), mit LPS nach 4h 2433 pg/ml (SD = 115,5), nach 24h 6872,7 pg/ml (SD = 878,1) und mit TNF nach 4h 3638 pg/ml (SD = 107) und nach 24h 7736 pg/ml (SD = 129,3).

Für IL-6 betrugen die entsprechenden mittleren Konzentrationen bei der Kontrolle nach 4h 227,8 pg/ml (SD = 23,4), nach 24h 646,6 pg/ml (SD = 58,6), bei monomerischem AAT nach 4h 244 pg/ml (SD = 5,4), nach 24h 958,2 pg/ml (SD = 57,7), bei polymerischem AAT nach 4h 286,9 (SD = 50,6), nach 24h 513 pg/ml (SD = 27), nach der Stimulation mit Prolastin™ nach 4h 227,7 pg/ml (SD = 38,2), nach 24h 836,9 pg/ml (SD = 31,4) und nach Stimulation mit LPS nach 4h 218,2 (SD = 17,7) und nach 24h 590,3 pg/ml (SD = 58,6). Zusätzlich wurde hier mit IL-8 und TNF stimuliert. Es zeigten sich IL-8 Konzentrationen nach 4h von 250,5 pg/ml (SD = 45), nach 24h 924 pg/ml (SD = 183,6) und für TNF nach 4h 300,2 pg/ml (SD = 61) und nach 24h 993,6 pg/ml (SD = 44,2).

Für MCP-1 betrugen die mittleren Konzentrationen bei der Kontrolle nach 4h 56,6 pg/ml (SD = 2,4) und nach 24h 60,5 pg/ml (SD = 4,6). Bei der Stimulation mit monomerischem AAT wurden nach 4h 53,5 pg/ml (SD = 3,1), nach 24h 57,2 pg/ml (SD = 2,2) und bei polymerischem AAT nach 4h 54 pg/ml (SD = 1,5) und nach 24h 61,3 pg/ml (SD = 1,6) gemessen. Die gemessenen MCP-1 Konzentrationen nach der Stimulation mit Prolastin™ betrugen nach 4h 52,1 pg/ml (SD = 2,7), nach 24h 58,5 pg/ml (SD = 1) und nach Stimulation mit LPS nach 4h 51 pg/ml (SD = 3,1) und nach 24h 56,7 pg/ml (SD = 0,7). Bei der Stimulation mit IL-8 und TNF wurden nach 4h IL-8 Werte

Ergebnisse

von 49 pg/ml (SD = 1,4), nach 24h von 50,8 pg/ml (SD = 6,3) und für TNF nach 4h 56,8 pg/ml (SD = 0,7) und nach 24h 470,9 pg/ml (SD = 46,9) beobachtet.

Die gemessenen Konzentrationen von IL-6, IL-8 und MCP-1 zeigen keine signifikanten Unterschiede als Reaktion auf die unterschiedlichen Stimuli. Die IL-6 und IL-8 Konzentrationen steigen signifikant im Vergleich der Messung von 4 h und 24 h.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene pulmonale sowie systemische Biomarker beim hereditären AATM und deren kurz- sowie mittelfristige Reaktion auf die Substitution mit AAT in vivo als auch in vitro untersucht mit dem Ziel, weitere Erkenntnisse über antiinflammatorische und immunmodulatorische Effekte des AAT zu generieren. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es die Bedeutung der AAT Polymere im Zusammenhang mit der Substitutionstherapie zu untersuchen.

AAT Konzentrationen im Serum steigen durch Substitution

Es wird gezeigt, dass es unmittelbar nach Substitution mit AAT zu einem Anstieg der Serumkonzentrationen kommt. Es erfolgt ein Abfall zu Tag 3 und schließlich werden die niedrigsten Konzentrationen an Tag 7 beziehungsweise vor Substitution gefunden. Die Konzentrationen befinden sich die ganze Zeit über der postulierten protektiven Schwelle von 50 g/L (Stoller 1997). Der in dieser Studie gefundene Verlauf der Serumkonzentrationen von AAT bestätigt die Ergebnisse der Literatur (Gadek et al. 1981; Hubbard et al. 1988; Wewers et al. 1987).

Die in dieser Arbeit erhobenen Serumkonzentrationen bei nicht substituierten, homozygoten PiZ AATM Patienten zeigen einen sehr geringen Schwankungsbereich. Zudem befinden sich alle Betroffenen unter der sogenannten protektiven Schwelle. Diese Schwelle stellt ein gedankliches Konstrukt dar, welches daraus abgeleitet wird, dass Patienten mit AAT Serumkonzentrationen unterhalb dieser Schwelle ein erhöhtes Risiko aufweisen, ein Lungenemphysem zu entwickeln (Stoller 1997). Unter Berücksichtigung dieses hypothetischen Konstrukts bestätigen diese Funde, dass nicht substituierte PiZ homozygote AAT Patienten ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Lungenemphysems aufweisen.

Konzentrationen der AAT Polymere steigen unmittelbar nach Substitution

Zum ersten Mal konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass es zwei Stunden nach Infusion mit AAT zu einem Anstieg der AAT-Polymere im Serum kommt. Drei Tage nach der Infusion mit AAT kehren die Polymerkonzentrationen im Serum der Betroffenen wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Hierbei besteht eine Korrelation zwischen den AAT Konzentrationen und den AAT-Polymerkonzentrationen, was einen

Zusammenhang des durch die Infusion bedingten Anstieges der AAT Konzentrationen und den vermehrten Konzentrationen von Polymeren im Serum nahelegt. Der zum Nachweis der Polymere verwendete ELISA ist hochspezifisch für AAT-Polymere (Miranda et al. 2010), kann allerdings nicht zwischen Z-Polymeren und M-Polymeren unterscheiden. Es ist davon auszugehen, dass das zugeführte AAT, welches in M-Konfiguration infundiert wird, am ehesten zu einem Anstieg der Konzentration der M-Polymere im Serum führt, wobei eine Evidenz fehlt.

Man ging lange Zeit davon aus, dass Polymere in den Hepatozyten intrazellulär gebildet werden und dort durch einen toxischen gain-of-function Mechanismus für die hepatischen Manifestationen beim hereditären AATM verantwortlich zu machen sind. In bisher durchgeführten Studien konnten jedoch, wie auch in dieser Studie, extrazellulär AAT Polymere nachgewiesen werden. In den Arbeiten aus der Literatur konnten sowohl im Serum (S. Janciauskiene et al. 2002), in der BAL (Elliott et al. 1998; Mulgrew et al. 2004), wie auch im Lungeninterstitium (Mahadeva et al. 2005) Polymere nachgewiesen werden. Es ist unklar, ob die extrazellulär gefundenen Polymere intrazellulär gebildet und dann sezerniert, oder aus Monomeren erst extrazellulär gebildet wurden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass aus Plasma isolierte korrekt konfigurierte polymerbildende Z-Monomere unter physiologischen Bedingungen zu Polymeren reagieren (Dafforn et al. 1999). Auch die Bildung sogenannter Heteropolymere aus Z- und S-Monomeren konnte nachgewiesen werden (Mahadeva et al. 1999). Die Polymerisierung von M-Monomeren konnte bisher nur unter unphysiologischen Bedingungen, z.B. der Erhitzung auf 60°C (Aldonyte et al. 2004), beobachtet werden. Ein Schritt in der Herstellung des Prolastin™, der pharmakologischen Darreichungsform des AAT, beinhaltet die Erhitzung auf 60°C für 10 Stunden zur Inaktivierung etwaig vorhandener Viren im gepoolten Plasma. Bei der Untersuchung des Prolastin™ zeigte sich zudem, dass eine zweite, nicht funktionelle monomere Fraktion zu finden ist (Lomas et al. 1997). Durch Auftrennung des Prolastin™ im Western Blot konnten große Anteile hochmolekularen Proteins (>100 kD) nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich am ehesten um AAT Polymere, da auch durch den zum Nachweis von Polymeren im Serum verwendeten polymerspezifischen ELISA große Anteile an Polymeren im Prolastin™ nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Erkenntnisse ist davon

auszugehen, dass es sich hierbei um Oligo- und Polymere handelt, welche im Rahmen des Erhitzungsprozesses und oder durch die hohen AAT Konzentrationen entstehen. Dieses Wissen legt nahe, dass durch die Infusion Polymere in den Körper gelangen und daraus ein Anstieg der Polymerkonzentration im Serum resultiert. Es ist nach dem derzeitigen Kenntnisstand jedoch nicht auszuschließen, dass es nach Infusion durch den unnatürlichen Anstieg von M-Monomerem AAT auch zur Bildung von Polymeren unter physiologischen Bedingungen kommt oder aber zu einem Einfluss auf intrinsisch gebildetes AAT und damit auch zu einer vermehrten Bildung von Z-Polymeren.

Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse sollten möglicherweise einige Aspekte der Substitutionstherapie diskutiert werden. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass AAT-Polymere ihre Funktion als Inhibitor der neutrophilen Elastase verlieren (Taggart et al. 2000). Unter diesem Gesichtspunkt sollten die effektiven Anteile an infundiertem polymerischem AAT also genauer erarbeitet werden, um so gegebenenfalls eine zu geringe Infusion von monomerischem AAT bei den betroffenen Patienten zu vermeiden, da der Anteil des funktionellen monomeren AAT unter Umständen deutlich geringer ist als bisher angenommen.

Zytokinkonzentrationen sind unter Substitutionstherapie nicht stabil

Um den Einfluss von substituiertem AAT auf immunologische Prozesse und zudem die postulierte antiinflammatorische Wirkung des AAT zu untersuchen, wurden die Konzentrationen verschiedener Zytokine im Serum zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. IL-1 β und IL-6 sollten hierbei der Evaluation akuter inflammatorischer Reaktionen dienen. IL-8 und TNF α spielen neben ihrer Funktion als Entzündungsmediatoren eine wichtige Rolle in der Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten (Baggiolini & Clark-Lewis 1992; Hehlhans & Pfeffer 2005). Die Belastung durch neutrophile Granulozyten hat entscheidenden Einfluss auf das im Pathomechanismus besprochene Ungleichgewicht von Proteasen und Antiproteasen (Woolhouse et al. 2002). MCP-1 dient der Evaluation des Einflusses von Monozyten auf die pathologischen Prozesse beim hereditären AATM (Boring et al. 1997). VEGF wird eine Beteiligung an der Instandhaltung der Lungenstruktur zugesprochen. Kasahara et al. zeigten, dass eine Blockade des VEGF Rezeptors zur Apoptose von Endothelzellen und zur Ausbildung eines Lungenemphysems führen können (Kasahara et al. 2000). In

der Zusammenschau der Datenlage ist die Rolle der genannten Mediatoren beim hereditären AATM und deren Reaktion auf die Substitution mit AAT bisher nur wenig untersucht.

In dieser Studie wird zum ersten Mal gezeigt, dass es bei den substituierten AATM Patienten im Zuge der Augmentationstherapie, zu einer Fluktuation der Serumkonzentrationen von Inflammationsmediatoren kommt. Im Besonderen zeigen IL-8 und MCP-1 eine starke Reaktion auf die Applikation von AAT. Die im Serum gemessene IL-8 Konzentration steigt unmittelbar nach Substitution von AAT und ist an Tag 3 post infusionem am höchsten. MCP-1 hingegen zeigt einen konträren Verlauf mit einem Abfall der Konzentrationen nach Infusion und den niedrigsten gemessenen Werten an Tag 3 nach Substitution. Es handelt sich hierbei also nicht um eine einheitliche Reaktion: So steigt IL-8 unmittelbar nach der Infusion und zur Mitte des wöchentlichen Zyklus an, MCP-1, VEGF und IL-6 jedoch fallen entweder kurz und/oder auch mittelfristig. Beim $\text{TNF}\alpha$ wurde keine Veränderung zwei Stunden nach der Infusion von AAT gefunden, es kommt jedoch zu einem signifikanten Anstieg an Tag 3. In keiner der Serumproben konnte IL-1 β nachgewiesen werden.

Bei der einzigen in vivo Studie, welche die IL-8 Konzentrationen bei AATM Patienten im EBC untersuchte, erfolgte die Bestimmung im EBC von substituierten AATM Patienten (Noeske 2011). Hierbei wurden analog zu dieser Studie die Konzentrationen an Tag 1, 3 und 6 bestimmt. Diese zeigen eine sehr starke Übereinstimmung mit dem hier beobachteten Verlauf. Die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten IL-8 Konzentrationen waren jedoch deutlich geringer als die in der vorliegenden Arbeit im Serum gemessenen. Dies ist physiologisch gut erklärbar, da das EBC aus der Ausatemluft gewonnen wird und zu einem großen Teil aus Wasser besteht.

Die umfangreichsten Daten zu immunologischen Interaktionen des AAT mit Zellen des Immunsystems wurden bisher jedoch in vitro erhoben. In der Pathogenese der mit dem AATM assoziierten Erkrankungen spielen unter anderem neutrophile Granulozyten und auch Monozyten eine wichtige Rolle.

In einer Studie wurde gezeigt, dass Monozyten mit der Ausschüttung von Zytokinen auf AAT reagieren (Aldonyte et al. 2004). Monozyten reagierten sowohl auf natives als

auch auf polymerisiertes AAT mit der Ausschüttung von IL-6, IL-8, TNF und MCP-1. Es zeigte sich dabei eine Abhängigkeit der Reaktion von den applizierten Konzentrationen. Die gemessenen Zytokinkonzentrationen korrelierten mit der Menge des applizierten nativen und polymerisierten AAT bis zu einem Maximum, nachdem es wieder zu einem Abfall der gemessenen Zytokinkonzentrationen kam. Es wurden weiterhin Unterschiede bei den Konzentrationen der ausgeschütteten Zytokine als Reaktion auf polymerisiertes und natives AAT festgestellt. In einer weiteren Studie wird gezeigt, dass AAT ebenso dazu führen kann, dass es zu einer verstärkten Zytokinausschüttung auf spezifische Reize wie z.B. LPS kommt (Subramaniam et al. 2010). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Stimulation von neutrophilen Granulozyten, wo ebenso von einer Abhängigkeit der Effekte des AAT von der Präsenz anderer Zellaktivatoren, wie LPS berichtet wurde. Persson et al. stellten bei Versuchen mit neutrophilen Granulozyten fest, dass bei solitärer Gabe von AAT ein überwiegend antiinflammatorischer Effekt vorliegt. In dieser Studie wurde auch gezeigt, dass es bei der Kombination mit geringen Mengen Endotoxin zu einer Unterdrückung der Freisetzung von IL-8 durch AAT kam, bei Applikation von AAT in Kombination mit großen Mengen Endotoxin, wurden die neutrophilen Granulozyten zusätzlich stark stimuliert (Persson et al. 2006). Somit ist davon auszugehen, dass die Effekte von AAT stark vom Vorhandensein anderer Zell stimulierender Einflüsse abhängig sind. Zu beachten ist, dass die beschriebenen Effekte alle unabhängig von dem in der Diskussion über die Pathogenese des auf dem AATM basierenden Lungenemphysems häufig in den Mittelpunkt gesetzten Proteasen-Antiproteasen Verhältnisses ablaufen. Die in dieser Studie gefundenen Reaktionen der Zytokine und Chemokine, im Besonderen von IL-8 und MCP-1, suggerieren eine AAT Funktion, die unter anderem die Regulation und Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten und Monozyten beinhaltet.

Als akute-Phase Protein steigen die Plasmakonzentrationen des AAT als Reaktion auf einen inflammatorischen Prozess auf bis zu 130 % und Höchstwerten bis zu 6 g/L an (Voulgari et al. 1982). Dies führt zu der Überlegung, dass nicht die AAT-Konzentrationen selbst, sondern die Fähigkeit im Rahmen einer Immunantwort mit einem Konzentrationsanstieg reagieren zu können entscheidender ist, um die Wirkung des AAT in der Regulation der Inflammation zu entfalten (Dickens & Lomas 2011). Dies

wäre eine mögliche Erklärung für die beobachtete immunologische Reaktion und damit die unphysiologischen Schwankungen der Mediatoren, da es durch die Infusion zu einer wöchentlichen, bis zu 4 fachen Steigerung der physiologischen AAT Spiegel kommt und damit eine akute-Phase-Reaktion simuliert wird. Die in vorigen Studien gemachten Beobachtungen der Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Wirkung des AAT (Subramaniyam et al. 2010) mit initial proinflammatorischen und langfristigen antiinflammatorischen Effekten unterstreicht diese These und verdeutlicht die Problematik des wöchentlichen Applikationszyklus und dem damit verbundenen Konzentrationsanstieg des Serum AATs.

Auch der weiter oben beschriebene Anstieg der Polymerkonzentrationen im Serum könnte eine entsprechende Reaktion hervorrufen. In publizierten in vitro Studien wurde die Funktion von extrazellulären Polymeren als proinflammatorische Stimuli beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass AAT-Polymere auch ohne Induktion von Mediatoren direkt chemotaktisch wirksam sein können (Mulgrew et al. 2004; Parmar et al. 2002). Demgegenüber konnte in anderen Studien für AAT-Polymere mitunter auch kein relevanter proinflammatorischer Effekt nachgewiesen werden (Janciauskiene et al. 2004). Eine mögliche Erklärung hierfür gibt die Gewinnung und die Verarbeitung der Polymere. Sowohl oxidierende Einflüsse, als auch die Kombination von AAT-Polymeren mit anderen Zellaktivatoren haben entscheidende Auswirkung auf die beobachteten Effekte (s.u.) (Persson et al. 2006). So konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass die wöchentlich infundierten Polymere zwar nicht per se einen toxischen Effekt haben, bei entsprechendem zusätzlichem Stimulus jedoch proinflammatorisches Potential besitzen (Li et al. 2009).

Nicht substituierte AATM Patienten haben höhere IL-8 und TNF Werte

In dieser Studie werden zum ersten Mal die systemischen Effekte der Substitution von AAT bei substituierten AATM Patienten mit einer Kontrollgruppe aus nicht substituierten AATM Patienten verglichen. Aufgrund der Behandlungsrichtlinien in der Bundesrepublik Deutschland ist die Gruppe der nicht substituierten Patienten relativ heterogen. Wenn das FEV₁ als Maß für die Progression der Erkrankung verwendet wird, sind die in der substituierten Studiengruppe eingeschlossenen Patienten im

Mittel schwerer krank. Der wichtigste Risikofaktor, das Rauchen, zeigt jedoch eine gute Vergleichbarkeit (s. Tabelle 2).

Es konnten in der nicht substituierten Gruppe höhere IL-8 und TNF Werte festgestellt werden, wenn man die Werte mit denen bei substituierten Patienten unmittelbar vor Substitution von AAT vergleicht. Besonders auffällig sind hier die in der nicht substituierten Gruppe deutlich höheren IL-8 Maximalwerte. Vergleicht man die an Tag 3 gemessenen Serumkonzentrationen mit denen der nicht augmentierten Gruppe, so finden sich keine signifikanten Unterschiede. Die im EBC festgestellten CRP Konzentrationen bei nicht substituierten AATM Patienten waren ebenfalls deutlich erhöht, dies soll jedoch separat diskutiert werden (s.u.).

In der Arbeit von Stockley et al. fand sich eine Reduktion von IL-8 und LTB₄ nach Substitutionstherapie (Stockley 2002). Dies wird durch die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten bestätigt. Dies war bisher die einzige Arbeit, welche die Reaktionen von Mediatoren auf die Substitution mit AAT untersuchte. Es wurde über ein Absinken der im induzierten Sputum gemessenen Konzentrationen von LTB₄ sowie IL-8 nach Substitutionstherapie über einen kurzen Zeitraum von 4 Wochen berichtet. Sowohl bei LTB₄ wie auch beim Zytokin IL-8 handelt es sich um Botenstoffe, welche eine entscheidende Rolle bei der Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten spielen. Eine Reduktion der Konzentrationen im Sputum deutet somit auf einen positiven Einfluss auf die Belastung der Lunge durch neutrophile Granulozyten hin. Auf dem Hintergrund der pathophysiologische Theorie wird so das Ungleichgewicht von Proteasen und Antiproteasen günstig beeinflusst, woraus ein positiver Effekt auf die Progression des Lungenemphysems resultieren könnte. Entsprechend wurde das Absinken der genannten Mediatoren als antiinflammatorischer Effekt des infundierten AAT interpretiert. Diese Schlussfolgerung bietet jedoch Grund zum Zweifel, da in dieser Studie trotz erniedrigter für neutrophile Granulozyten chemoattraktiver Zytokine keine Reduktion der Konzentrationen der Myeloperoxidase, einem Marker für neutrophile Granulozyten und deren Aktivierung, festgestellt werden konnte (Riise et al. 1995). Eine mögliche Erklärung hierfür könnten die in der hier vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen zum Anstieg der Polymere geben. Für AAT-Polymere konnte eine von Mediatoren unabhängige chemotaktische Wirkung gezeigt werden (Parmar et al.

2002). Damit würde die Persistenz der NE Aktivität trotz reduzierter chemotaktisch wirksamer Zytokine erklärt.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden bei den nicht substituierten AATM Patienten IL-8 Werte im Serum von bis zu 15 pg/ml gemessen. Andere nicht substituierte Studienteilnehmer wiederum weisen keine großen Unterschiede bei den gemessenen Konzentrationen auf. Auch in diesem Zusammenhang könnte es also eine Rolle spielen, dass nicht die gegebenen AAT Grundkonzentrationen der entscheidende Faktor sind, sondern die Fähigkeit bei Präsenz von proinflammatorischen Stimuli mit der entsprechenden Steigerung reagieren zu können. Es konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen von 0,5 mg/dl, was in etwa den im Serum von nicht substituierten Patienten gemessenen Konzentrationen entspricht, bereits ausreichen, um die durch proinflammatorischen Stimuli erzeugte Ausschüttung von Zytokinen zu unterdrücken oder zu reduzieren. Dieser Effekt wird auch durch Erhöhung der eingesetzten Konzentrationen in vitro nicht deutlich gesteigert (Nita et al. 2005). Mit dieser Theorie einher geht die Beobachtung, dass je größer die gemessenen Entzündungswerte vor Substitution sind, desto stärker wirkt sich die Substitution mit AAT auf diese aus (Stockley et al. 2000; Stockley 2002). Die von Liebermann et al. gemachte retrospektive Beobachtung der Verminderung von Exazerbationen bei substituierten AATM Patienten bietet das klinische Korrelat zu den oben beschriebenen antiinflammatorischen Effekten (Lieberman 2000). So konnten die überschießenden inflammatorischen Reaktionen durch die Substitution von AAT offensichtlich besser kontrolliert werden.

MCP-1 sinkt im Wochenverlauf nach Substitution von AAT

Ein beim hereditären AATM wenig untersuchtes Zytokin ist das MCP-1. In der hier vorliegenden Arbeit zeigt MCP-1 bei substituierten Probanden einen Abfall direkt nach Substitution und weiter im Verlauf der Woche. Nicht substituierte AATM Patienten zeigen niedrigere MCP-1 Serumspiegel als substituierte vor und nach Substitution und ähnliche Konzentrationen wie an Tag 3 nach Substitution.

In in vivo Studien konnte MCP-1 als wichtiges chemotaktisches Zytokin für Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten identifiziert werden (Boring et al. 1997; Kurihara et al.

1997; Lu et al. 1998). Durch die Antagonisierung von CCR2, dem zugehörigen Rezeptor für MCP-1, wurde ein negativer Effekt auf die bakterielle Clearance (Kurihara et al. 1997), sowie bronchiale Hyperreagibilität (Gonzalo et al. 1998) nachgewiesen. Hautamaki et al. zeigten im Mausmodell, dass es durch Applikation von MCP-1 zu einem erhöhten Influx von Monozyten und zu einer Verstärkung von durch Rauchen verursachtem Lungenemphysem kommt (Hautamaki et al. 1997). Andere Funktionen von MCP-1 beinhalten die Förderung epithelialer Wundheilung durch proliferierende und migrationsfördernde Effekte auf die Lungenepithelien (Salcedo et al. 2000; Weber et al. 1999).

Durch die wichtige Bedeutung des MCP-1 für das Migrationsverhalten von Monozyten muss in diesem Zusammenhang auch deren potentielle Relevanz in der Pathogenese des AATM betrachtet werden. Alveolare Makrophagen spielen eine nicht unerhebliche Rolle als Produzenten von AAT direkt in der Lunge. Hier findet sich bei PiZZ Patienten eine ähnlich verringerte Produktion der Makrophagen wie dies beim Vergleich der hepatozytären Produktion zu beobachten ist (Mornex et al. 1986). Van 't Wout et al. konnten zeigen, dass es Unterschiede in den Subpopulationen von aus gesunden humanen Spendern isolierten Makrophagen gibt (van 't Wout et al. 2011). Die verschiedenen Subpopulationen wurden auf die Produktion von AAT nach Exposition mit verschiedenen Stimuli untersucht und es wurde gezeigt, dass die proinflammatorischen Subpopulationen mit einer vermehrten Ausschüttung von AAT reagierten.

Makrophagen und MCP-1 spielen in der bisherigen Diskussion um die Pathogenese des durch den AATM bedingten Lungenemphysems nur eine untergeordnete Rolle. Es ist bekannt, dass bei der durch Zigarettenrauch bedingten Form der COPD erhöhte MCP-1 Spiegel mit einer erhöhten Makrophagenbelastung der Lunge verbunden sind (Capelli et al. 1999; Fuke et al. 2004). Eine Reduktion der MCP-1 Spiegel könnte also mit einer Verminderung der Belastung und damit einem etwaigen positiven Effekt auf die Progression des Lungenemphysems verbunden sein.

Nicht substituierte Patienten haben höhere CRP Konzentrationen im EBC

Beim AATM ist die pulmonale Symptomatik zumeist führend. Um neben den systemischen auch die pulmonalen Effekte zu untersuchen wurden die Konzentrationen der inflammatorischen Marker im EBC der substituierten und nicht substituierten AATM Patienten bestimmt. In früheren Studien konnten Inflammationsmarker, wie IL-1b, -6, -8, -10 und TNF α im EBC mit Hilfe eines *Multiplex Bead Assays* nachgewiesen und quantifiziert werden (Sack et al. 2006; Gessner et al. 2005). Hierfür wurden die EBC Proben konzentriert. Signifikante Unterschiede konnten nur in den Studiengruppen mit akuten entzündlichen Prozessen wie einem akuten respiratorischen Syndrom (ARDS) oder einer Exazerbation bei vorbestehender COPD beobachtet werden. Bisher bei AATM Patienten im EBC gemessene IL-8 Konzentrationen lagen im niedrigen fg/l Bereich, und damit unterhalb der Nachweisgrenze bisher erhältlicher *Multiplex Assays* (Noeske 2011).

Ein Nachweis spezifischer Mediatoren mittels eines *Multiplex Bead Assays* gelang in der hier vorliegenden Arbeit auch nach Konzentration der Proben nicht. CRP wurde als ein weiterer unspezifischer Surrogat Parameter zur Messung der pulmonalen inflammatorischen Prozesse im EBC verwendet.

Bei der Messung des CRP im EBC wurden deutliche Unterschiede in den Konzentrationen zwischen den nicht substituierten und substituierten Probanden festgestellt. In der nicht augmentierten Gruppe fanden sich signifikant höhere CRP Konzentrationen im EBC. Die CRP Konzentrationen im EBC bei substituierten Probanden waren sowohl vor, 2 Stunden nach und an Tag 3 nach Substitution deutlich niedriger als bei nicht substituierten AATM Patienten. Bei substituierten Patienten stiegen die Konzentrationen sowohl 2 Stunden nach Substitution als auch im Verlauf der Woche an. Zur Überprüfung, ob eine Korrelation mit den CRP-Konzentrationen im Serum vorliegt, wurden hier ebenfalls die Konzentrationen bestimmt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der CRP Werte im Serum festgestellt werden und es bestand keine Korrelation mit den CRP Werten im EBC.

Erstmalig wurde CRP im EBC zur Evaluierung lokaler entzündlicher Prozesse in der Lunge von Ueno et al. verwendet (Ueno et al. 2008). Die in der Literatur beschriebenen

Diskussion

Werte befinden sich im gleichen Bereich wie die in der hier vorliegenden Arbeit. In einer weiteren Studie von Zietkowski et al. wurden CRP Konzentrationen bei stabiler sowie instabiler Asthmaerkrankung gemessen und deren Ansprechen auf inhalative Kortikosteroide (ICS) verglichen (Zietkowski et al. 2009). Die gefundenen Werte erwiesen sich als guter Indikator für den Schweregrad der Erkrankung. Die gemessenen Konzentrationen zeigten zudem eine starke Korrelation mit den Serumkonzentrationen.

Bislang besteht keine ausreichende Datenlage zur Beurteilung der Aussagekraft der CRP Konzentrationen im EBC. Legt man die bisher durchgeführten Studien zugrunde, geben erhöhte CRP Konzentrationen im EBC einen Hinweis auf eine erhöhte entzündliche Aktivität in der Lunge. Die gemessenen niedrigeren CRP Konzentrationen im EBC der substituierten AATM Patienten könnten also ein Hinweis auf eine niedrigere entzündliche Aktivität im Vergleich zur nicht substituierten Studiengruppe sein. Ferner ist ein Anstieg in der substituierten Gruppe im Verlauf der Woche zu erkennen. Auch hier, ähnlich dem Verlauf einiger Zytokine, im Besonderen des IL-8, zeigt sich eine Reaktion auf die Applikation von AAT. Im Serum konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Es handelt sich bei den beobachteten Unterschieden der CRP Konzentrationen im EBC um vergleichsweise geringe Veränderungen. Diese geringen Konzentrationsänderungen sind im Serum aufgrund der physiologischerweise höheren CRP Konzentrationen unter Umständen nicht messbar. Eine lokale Produktion von CRP in der Lunge durch alveolare Makrophagen konnte in diesem Zusammenhang bereits nachgewiesen werden (Dong & Wright 1996).

In Vitro

NG reagieren unterschiedlich auf Stimulation mit AAT-Monomer, AAT-Polymer und Prolastin™ vor und nach Substitution

Zur Untersuchung der Effekte verschiedener Konformationsformen des AAT auf die neutrophilen Granulozyten (NG) von AATM Patienten wurde aus der kommerziell erhältlichen Form Prolastin™ die hochmolekulare Fraktion (>100 kD) und die niedermolekulare Fraktion (<100 kD und >30 kD) isoliert. Bei dem hochmolekularen

Diskussion

Anteil handelt es sich am ehesten um AAT-Polymere, bei der niedermolekularen Fraktion entsprechend um AAT-Monomere. Bei der Verwendung von Prolastin™ sind beide Fraktionen enthalten. Es erfolgte die Stimulation von aus PiZ homozygoten AATM Patienten vor und nach der Substitution mit AAT isolierten NG mit den verschiedenen Fraktionen.

Bei der Stimulation der vor Substitution mit AAT isolierten neutrophilen Granulozyten mit AAT-Monomeren kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-8 im Vergleich zur Kontrolle. Polymeres AAT als auch Prolastin™ hingegen führen zu erniedrigten IL-8 Konzentrationen in den Zellüberständen im Vergleich zur Kontrolle. In den Überständen der mit Polymeren stimulierten NG zeigen sich die niedrigsten, in den mit LPS stimulierten jeweils die höchsten IL-8 Konzentrationen.

Bei den nach der Substitution isolierten NG sind die Unterschiede in den gemessenen IL-8 Konzentrationen weniger ausgeprägt. Analog zu den vor der Substitution isolierten NG sind die gemessenen IL-8 Konzentrationen nach Stimulation mit Monomer höher als bei der Kontrolle. Hier besteht jedoch kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der gemessenen IL-8 Konzentrationen nach Stimulation mit Prolastin™ und der Kontrolle. Diese Beobachtung könnte auf einen bereits in vivo erfolgten Effekt des substituierten AAT hindeuten, wonach in vitro kein entsprechender Konzentrationsanstieg von AAT-Monomeren durch Stimulation mit Prolastin™, jedoch durch Stimulation mit der niedermolekularen Fraktion erfolgt.

Im Vergleich der jeweiligen Stimuli vor und nach Substitution zeigt sich bei Betrachtung aller Daten keine Systematik. Es kann jedoch in zwei Subpopulationen, in positive Responder und negative Responder, eingeteilt werden. Hierbei reagieren die NG der positiven Responder auf alle Stimuli nach Substitution mit einem deutlichen Anstieg der IL-8 Ausschüttung, die NG der negativen Responder entsprechend mit einer Verminderung der IL-8 Sekretion.

Für AAT sind in bisherigen Studien sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte nachgewiesen. Diese zeigen unter anderem eine Abhängigkeit von Zeit und Konzentration. AAT verstärkt nach einer kurzen Zeitspanne von 2-4 Stunden die (LPS)-induzierte proinflammatorische Antwort, nach 18-48 Stunden hingegen reduzierte die

Zugabe von AAT die Expression von TNF, IL-1 β und IL-8 und verstärkt die Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 (Subramaniam et al. 2010). Es erfolgt also ein Wandel von einer initialen proinflammatorischen zu einer späteren antiinflammatorischen Wirkung. Analog sind konzentrationsabhängige pro- also auch antiinflammatorische Effekte des AAT auf humane Monozyten beschrieben. Auch Unterschiede bei der Stimulation mit den unterschiedlichen Konformationen sind beschrieben (Persson et al. 2006; Aldonyte et al. 2004). In der hier vorliegenden Arbeit konnten Unterschiede in den gemessenen IL-8 Konzentrationen als Reaktion auf die verschiedenen Fraktionen bestätigt werden. Die Reaktion auf die Stimulation mit der kommerziell erhältlichen Form Prolastin™ verhält sich dabei ähnlich der isolierten hochmolekularen Fraktion, welche zum größten Teil AAT-Polymere enthält. Hierbei kann es sich sowohl um eine inaktive, als auch um eine alternierte Wirkung der AAT-Polymere im Vergleich zu den AAT-Monomeren handeln.

Nachweisbare toxische Effekte der AAT Polymere auf die isolierten neutrophilen Granulozyten konnten nach Stimulation mit polymerem AAT und Prolastin™ nicht beobachtet werden.

AAT Polymere zeigen keine toxischen Effekte auf primäre humane Lungenepithelzellen

Zur Überprüfung etwaiger toxischer oder stimulatorischer Effekte der verschiedenen AAT Fraktionen auf die Lunge wurden primäre humane Lungenepithelzellen in einem *Air Liquid Interface* Zellkultur System verwendet (Bals et al. 2004). Hierbei hat man die Möglichkeit, die Zellen von basal, dies entspricht Stimuli, welche in vivo vom Blut ausgehen, und auch apikal, dies entspricht in vivo z.B. inhalierten Noxen, zu stimulieren. Da hierbei mögliche Effekte der im Prolastin™ vorhandenen verschiedenen Fraktionen studiert werden sollten, erfolgte in dieser Studie die Stimulation der Zellen von basal.

Es zeigten sich bei der Stimulation von basal keine signifikanten Unterschiede in der Sekretion von IL-6, IL-8 und MCP-1 als Reaktion auf Prolastin™ und seine hoch- und niedermolekulare Fraktion. Bei IL-6 und IL-8 konnte jedoch für alle Stimuli ein signifikanter Anstieg nach 24h beobachtet werden. Die Positivkontrolle erfolgte durch

Diskussion

die Stimulation der Zellen mit TNF α und der Messung von MCP-1, wobei sich eine deutliche Steigerung nach 24 Stunden zeigte. Diese Funde bestätigen die in einer Studie von Li et al. gemachten Beobachtungen. Auch hier konnte keinerlei Effekte durch Stimulation mit nativem AAT-Monomeren oder -Polymeren auf die Sekretion von IL-8 und MCP-1 gefunden werden. Erst nach Oxidation von AAT zeigten sich eine deutliche Steigerung der Konzentrationen von IL-8 und MCP-1 (Li et al. 2009).

Diese Beobachtungen bestätigen die zuvor bereits diskutierte Abhängigkeit der Toxizität von AAT-Monomeren und -Polymeren von post-translationalen Modifizierungen wie Oxidation. Es lässt sich daraus ableiten, dass oxidierende Umwelteinflüsse wie Zigarettenrauch und Infekte durch diese Modifikationen einen Einfluss auf den Krankheitsprogress bei AATM Patienten ausüben könnten.

Grenzen der Studie

Bei der Diskussion der in der hier vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sind zum Ersten die vergleichsweise geringen Patientenzahlen in den untersuchten Studiengruppen kritisch zu sehen. Bei seltenen Erkrankungen stellt im Besonderen der monozentrische Studienansatz bei der Patientenrekrutierung ein Problem dar, da selten höhere Patientenzahlen eingeschlossen werden können. Dies ist jedoch die erste Studie, welche die immunologischen Effekte der Augmentationstherapie mit humanem AAT untersucht, welche nicht substituierte Patienten mit PiZZ Genotyp als Vergleichsgruppe bietet. Die Gruppe der nicht substituierten Patienten ist allerdings aufgrund der Behandlungsrichtlinien in Deutschland und des häufig völlig unterschiedlichen klinischen Manifestationsgrades sehr heterogen.

Zum Zweiten ist es nicht gelungen Mediatoren und Zytokine auch im EBC und damit spezifisch für die Lunge zu evaluieren. Mit den bis dato verfügbaren Methoden ist es nicht möglich alle Zytokine im EBC nachzuweisen. Wie in anderen Versuchen festgestellt wurde, befinden sich die Zytokinkonzentrationen im EBC z.B. für IL-8 im femtogramm pro Milliliter Bereich, die Sensitivität des verwendeten *Multiplex Bead Assays* betrug, wie bei den meisten kommerziell erhältlichen ELISA, 1,2 pg/ml. Für zukünftige Studien müssten also entsprechend sensitivere Methoden, Konzentrierungen und oder andere Verfahren gewählt werden, die einen Zugang zur

Diskussion

Lunge ermöglichen. Bei den niedrigen Konzentrationen ist natürlich auch die Fehleranfälligkeit durch die Verarbeitung der Probe kritisch zu diskutieren. Bislang sind viele der zur Verfügung stehenden Verfahren wie Sputuminduktion, Bronchoskopie etc. aber deutlich invasiver. Letzteres ist aufgrund des invasiven Zugangs im Besonderen für die hiesigen Fragestellungen, für die es mehrfache Messungen der Patienten bedurfte, nicht gut geeignet.

Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass AAT neben der häufig diskutierten Wirkung im Proteasen-Antiproteasen Verhältnis wichtige antiinflammatorische und immunregulatorische Eigenschaften aufweist. Sein Einfluss auf die Serumkonzentrationen der Zytokine IL-8 und MCP-1 lässt außerdem einen Einfluss auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten vermuten.

Wie im Rahmen dieser Studie zudem zum ersten Mal gezeigt werden konnte, kommt es im Zuge der Substitution auch zu einem Anstieg der AAT-Polymere im Serum. Im Zellversuch wurden unterschiedliche Wirkungen der verschiedenen AAT-Konformationen nachgewiesen. Eine toxische Wirkung von nicht modifizierten Polymeren auf humane Bronchialepithelzellen konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Im Vergleich mit den nicht substituierten Patienten deuten die gemessenen höheren CRP Konzentrationen im EBC als auch die IL-8 Serumwert auf einen antiinflammatorischen Effekt des augmentierten AATs hin.

In zukünftigen Studien sollten die immunologischen Effekte des AAT auf molekularer Ebene weiter untersucht werden, um die genauen Effekte der Substitutionstherapie besser zu verstehen. Auch die Ursachen für die oben beschriebenen unterschiedlichen Reaktionen der positiven und negativen „Responder“ stellt ein interessantes Forschungsziel dar. Dies könnte ein zelluläres Konzept für ein Ansprechen auf die Substitutionstherapie darstellen.

6 Literaturverzeichnis

- Alam, S. et al., 2011. Oxidation of Z α 1-antitrypsin by cigarette smoke induces polymerization: a novel mechanism of early-onset emphysema. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 45(2), pp.261-9.
- Albes, B. et al., 2001. [Panniculitis revealing alpha-1 antitrypsin deficiency. Report of 3 cases]. *Annales de médecine interne*, 152(8), pp.502-6.
- Aldonyte, R., Jansson, L. & Janciauskiene, S., 2004. α 1-antitrypsin on primary human monocytes, in vitro. *BMC Cell Biology*, 11, pp.1-11.
- Anon, 1998. Survival and FEV1 decline in individuals with severe deficiency of alpha1-antitrypsin. The Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 158(1), pp.49-59.
- Audrain, M.A. et al., 2001. Analysis of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): frequency and specificity in a sample of 191 homozygous (PiZZ) alpha1-antitrypsin-deficient subjects. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 16(1), pp.39-44.
- Baggiolini, M. & Clark-Lewis, I., 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. , 307(I), pp.97-101.
- Bakker, M.E. et al., 2005. Variability in densitometric assessment of pulmonary emphysema with computed tomography. *Investigative radiology*, 40(12), pp.777-83.
- Bals, R. et al., 2004. Isolation and air-liquid interface culture of human large airway and bronchiolar epithelial cells. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 3 Suppl 2, pp.49-51.
- Barker, A.F. et al., 1997. Pharmacokinetic study of alpha1-antitrypsin infusion in alpha1-antitrypsin deficiency. *Chest*, 112(3), pp.607-13.
- Blanco, I. et al., 2006. Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in European countries. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 27(1), pp.77-84.
- Borawski, J., Naumnik, B. & Myśliwiec, M., 2003. Serum alpha1-antitrypsin but not complement C3 and C4 predicts chronic inflammation in hemodialysis patients. *Renal failure*, 25(4), pp.589-93.].
- Boring, L. et al., 1997. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *The Journal of clinical investigation*, 100(10), pp.2552-61.

- Callea, F. et al., 1997. alpha 1-Antitrypsin (AAT) deficiency and ANCA-positive systemic vasculitis: genetic and clinical implications. *European journal of clinical investigation*, 27(8), pp.696-702.
- Campos, M.A. et al., 2005. Trends in the diagnosis of symptomatic patients with alpha1-antitrypsin deficiency between 1968 and 2003. *Chest*, 128(3), pp.1179-86.
- Capelli, A. et al., 1999. Increased MCP-1 and MIP-1beta in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitics. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 14(1), pp.160-5.
- Carpagnano, G.E. et al., 2003. Increased leukotriene B4 and interleukin-6 in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 167(8), pp.1109-12.
- Carrell, Robin W & Lomas, David A, 2002. Alpha1-antitrypsin deficiency--a model for conformational diseases. *The New England journal of medicine*, 346(1), pp.45-53.
- Casaburi, R. et al., 2005. Improvement in exercise tolerance with the combination of tiotropium and pulmonary rehabilitation in patients with COPD. *Chest*, 127(3), pp.809-17.
- Cichy, J., Potempa, J. & Travis, J., 1997. Biosynthesis of alpha1-proteinase inhibitor by human lung-derived epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*, 272(13), pp.8250-5.
- Dafforn, T.R. et al., 1999. A kinetic mechanism for the polymerization of alpha1-antitrypsin. *The Journal of biological chemistry*, 274(14), pp.9548-55.
- Dahl, M. et al., 2002. Change in lung function and morbidity from chronic obstructive pulmonary disease in alpha1-antitrypsin MZ heterozygotes: A longitudinal study of the general population. *Annals of internal medicine*, 136(4), pp.270-9.
- Davis, I.D. et al., 1992. The pathologic spectrum of the nephropathy associated with alpha 1-antitrypsin deficiency. *Human pathology*, 23(1), pp.57-62.
- Dickens, J. a & Lomas, D. a, 2011. Why has it been so difficult to prove the efficacy of alpha-1-antitrypsin replacement therapy? Insights from the study of disease pathogenesis. *Drug design, development and therapy*, 5, pp.391-405.
- Dirksen, A. et al., 1999. A randomized clinical trial of alpha(1)-antitrypsin augmentation therapy. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 160(5 Pt 1), pp.1468-72.
- Dirksen, A. et al., 2009. Exploring the role of CT densitometry: a randomised study of augmentation therapy in alpha1-antitrypsin deficiency. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 33(6), pp.1345-53.

- Dong, Q. & Wright, J.R., 1996. Expression of C-reactive protein by alveolar macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 156(12), pp.4815-20.
- Dowson, L.J., Guest, P.J. & Stockley, R A, 2001. Longitudinal changes in physiological, radiological, and health status measurements in alpha(1)-antitrypsin deficiency and factors associated with decline. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 164(10 Pt 1), pp.1805-9.
- Dragonieri, S. et al., 2007. An electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 120(4), pp.856-62.
- Dragonieri, S. et al., 2009. An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 64(2), pp.166-70.
- Dubois, P. et al., 1994. Prognosis of severely hypoxemic patients receiving long-term oxygen therapy. *Chest*, 105(2), pp.469-74.
- Eaton, T. et al., 2004. Long-term oxygen therapy improves health-related quality of life. *Respiratory medicine*, 98(4), pp.285-93.
- Eden, E et al., 1997. Atopy, asthma, and emphysema in patients with severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 156(1), pp.68-74.
- Eden, Edward et al., 2003. Asthma features in severe alpha1-antitrypsin deficiency: experience of the National Heart, Lung, and Blood Institute Registry. *Chest*, 123(3), pp.765-71.
- Edmonds, B.K., Hodge, J.A. & Rietschel, R.L., 1991. Alpha 1-antitrypsin deficiency-associated panniculitis: case report and review of the literature. *Pediatric dermatology*, 8(4), pp.296-9.
- Elliott, P.R., Bilton, D. & Lomas, D A, 1998. Lung polymers in Z alpha1-antitrypsin deficiency-related emphysema. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 18(5), pp.670-4.
- Elzouki, A.N. et al., 1997. Severe alpha1-antitrypsin deficiency (PiZ homozygosity) with membranoproliferative glomerulonephritis and nephrotic syndrome, reversible after orthotopic liver transplantation. *Journal of hepatology*, 26(6), pp.1403-7.
- Elzouki, A.N. et al., 1996. Wegener's granulomatosis in a patient with severe PiZZ alpha 1-antitrypsin deficiency. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*, 89(11), p.877.

- Eriksson, S., Carlson, J. & Velez, R., 1986. Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha 1-antitrypsin deficiency. *The New England journal of medicine*, 314(12), pp.736-9.
- Fens, N. et al., 2009. Exhaled breath profiling enables discrimination of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 180(11), pp.1076-82.
- Fuke, S. et al., 2004. Chemokines in bronchiolar epithelium in the development of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 31(4), pp.405-12.
- Gadek, J.E. et al., 1981. Replacement therapy of alpha 1-antitrypsin deficiency. Reversal of protease-antiprotease imbalance within the alveolar structures of PiZ subjects. *The Journal of clinical investigation*, 68(5), pp.1158-65.
- Garey, K.W. et al., 2004. Markers of inflammation in exhaled breath condensate of young healthy smokers. *Chest*, 125(1), pp.22-6..
- Gessner, C. et al., 2005. Exhaled breath condensate cytokine patterns in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory medicine*, 99(10), pp.1229-40.
- Gonzalo, J.A. et al., 1998. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *The Journal of experimental medicine*, 188(1), pp.157-67.
- Gooptu, B. & Lomas, David A, 2008. Polymers and inflammation: disease mechanisms of the serpinopathies. *The Journal of experimental medicine*, 205(7), pp.1529-34.
- Halle, M. et al., 2008. [Evidence and technique for exercise training in patients with COPD]. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)*, 62(4), pp.209-21; quiz 222-3.
- Hattesoehl, A.D.M. et al., 2011. Discrimination between COPD with and without alpha 1-antitrypsin deficiency using an electronic nose. *Respirology (Carlton, Vic.)*.
- Hautamaki, R.D. et al., 1997. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5334), pp.2002-4.
- Hehlhans, T. & Pfeffer, K., 2005. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, 115(1), pp.1-20.
- Hill, A.T. et al., 1999. Evidence for excessive bronchial inflammation during an acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease in patients with alpha(1)-antitrypsin deficiency (PiZ). *American journal of respiratory and critical care medicine*, 160(6), pp.1968-75.

- Horváth, I. et al., 2005. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 26(3), pp.523-48.
- Hubbard, R.C. et al., 1988. Biochemical efficacy and safety of monthly augmentation therapy for alpha 1-antitrypsin deficiency. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 260(9), pp.1259-64.
- Hunt, J.F. et al., 2000. Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 161(3 Pt 1), pp.694-9.
- Hüttmann, E.-M. et al., 2011. Comparison of Two Devices and Two Breathing Patterns for Exhaled Breath Condensate Sampling M. Rojas, ed. *PLoS ONE*, 6(11), p.e27467.
- Janciauskiene, S. et al., 2002. Detection of circulating and endothelial cell polymers of Z and wild type alpha 1-antitrypsin by a monoclonal antibody. *The Journal of biological chemistry*, 277(29), pp.26540-6.
- Janciauskiene, S. et al., 2004. Divergent effects of alpha1-antitrypsin on neutrophil activation, in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*, 315(2), pp.288-96.
- Janciauskiene, S.M. et al., 2011. The discovery of α 1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respiratory medicine*, 105(8), pp.1129-39.
- Janus, E.D., Phillips, N.T. & Carrell, R W, 1985. Smoking, lung function, and alpha 1-antitrypsin deficiency. *Lancet*, 1(8421), pp.152-4.
- Jeppsson, J.O., 1976. Amino acid substitution Glu leads to Lys alpha1-antitrypsin PiZ. *FEBS letters*, 65(2), pp.195-7.
- Kasahara, Y. et al., 2000. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *The Journal of clinical investigation*, 106(11), pp.1311-9.
- Koczulla, a.-R., Greulich, T., et al., 2011. Copd. *Der Pneumologe*, pp.1-13.
- Koczulla, R et al., 2008. [The German registry of individuals with alpha-1-antitrypsin deficiency--a source for research on patient care]. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)*, 62(11), pp.655-8.
- Koczulla, Rembert, Hattesohl, A., et al., 2011. MCC/IMS as potential noninvasive technique in the diagnosis of patients with COPD with and without alpha 1-antitrypsin deficiency. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry*.
- Kurihara, T. et al., 1997. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *The Journal of experimental medicine*, 186(10), pp.1757-62.

- LAURELL, C.-B. & ERIKSSON, S., 1963. The electrophoretic alpha-1-globulin pattern of serum in alpha-1 antitrypsin deficiency. *Scan J Clin Lab Invest*, 15, pp.132-140.
- LAURELL, C.B. & ERIKSSON, S., 1965. The serum alpha-1-antitrypsin in families with hypo-alpha-1-antitrypsinemia. *Clin. Chim. Acta*, 11, pp.395-398.
- Lhotta, K. et al., 1994. Alpha 1-antitrypsin phenotypes in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-positive vasculitis. *Clinical science (London, England : 1979)*, 87(6), pp.693-5.
- Li, Z. et al., 2009. Oxidized {alpha}1-antitrypsin stimulates the release of monocyte chemotactic protein-1 from lung epithelial cells: potential role in emphysema. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 297(2), pp.L388-400.
- Lieberman, J., 2000. Augmentation therapy reduces frequency of lung infections in antitrypsin deficiency: a new hypothesis with supporting data. *Chest*, 118(5), pp.1480-5.
- Lomas, D A et al., 1995. alpha 1-Antitrypsin Mmalton (Phe52-deleted) forms loop-sheet polymers in vivo. Evidence for the C sheet mechanism of polymerization. *The Journal of biological chemistry*, 270(28), pp.16864-70.
- Lomas, D A, Elliott, P.R. & Carrell, R W, 1997. Commercial plasma α 1 -antitrypsin (Prolastin™ ®) contains a conformationally inactive , latent component. *European Respiratory Journal*, pp.672-675.
- Lomas, D A et al., 1992. The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature*, 357(6379), pp.605-7.
- Loreno, M. et al., 2002. Combined liver-kidney transplantation in a 15-year-old boy with alpha1-antitrypsin deficiency. *Journal of hepatology*, 36(4), pp.565-8.
- Lu, B. et al., 1998. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*, 187(4), pp.601-8.
- Mahadeva, R et al., 1999. Heteropolymerization of S, I, and Z alpha1-antitrypsin and liver cirrhosis. *The Journal of clinical investigation*, 103(7), pp.999-1006.
- Mahadeva, Ravi et al., 2005. Polymers of Z alpha1-antitrypsin co-localize with neutrophils in emphysematous alveoli and are chemotactic in vivo. *The American journal of pathology*, 166(2), pp.377-86.
- Martin, J.P. et al., 1976. Genetic variants of serum alpha1-antitrypsin (Pi types) in Portuguese. *Human heredity*, 26(4), pp.310-4.

- McElvaney, N.G. et al., 1997. Baseline characteristics of enrollees in the National Heart, Lung and Blood Institute Registry of alpha 1-antitrypsin deficiency. Alpha 1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group. *Chest*, 111(2), pp.394-403.
- McRae, K. et al., 2001. Detection of IL-10 in the exhaled breath condensate, plasma and tissue during ischemia-reperfusion injury in experimental lung transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 20(2), p.184.
- Miranda, E. et al., 2010. A novel monoclonal antibody to characterize pathogenic polymers in liver disease associated with alpha1-antitrypsin deficiency. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 52(3), pp.1078-88.
- Miravittles, M. et al., 2010. Laboratory testing of individuals with severe alpha1-antitrypsin deficiency in three European centres. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 35(5), pp.960-8.
- Mornex, J.F. et al., 1986. Expression of the alpha-1-antitrypsin gene in mononuclear phagocytes of normal and alpha-1-antitrypsin-deficient individuals. *The Journal of clinical investigation*, 77(6), pp.1952-61.
- Morrison, D.A. & Stovall, J.R., 1992. Increased exercise capacity in hypoxemic patients after long-term oxygen therapy. *Chest*, 102(2), pp.542-50.
- Mulgrew, A.T. et al., 2004. Z alpha1-antitrypsin polymerizes in the lung and acts as a neutrophil chemoattractant. *Chest*, 125(5), pp.1952-7.
- Mutlu, G.M. et al., 2001. Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 164(5), pp.731-7.
- Nita, I. et al., 2005. Prolastin™, a pharmaceutical preparation of purified human alpha1-antitrypsin, blocks endotoxin-mediated cytokine release. *Respiratory research*, 6, p.12.
- Noeske, S., 2011. Nachweis von Alpha-1-Antitrypsin in exhalierem Atemwegskondensat.
- Owen, M.C., Carrell, R W & Brennan, S.O., 1976. The abnormality of the S variant of human alpha-1-antitrypsin. *Biochimica et biophysica acta*, 453(1), pp.257-61.
- Pan, S. et al., 2009. Single nucleotide polymorphism-mediated translational suppression of endoplasmic reticulum mannosidase I modifies the onset of end-stage liver disease in alpha1-antitrypsin deficiency. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50(1), pp.275-81.

- Parmar, J.S. et al., 2002. Polymers of alpha(1)-antitrypsin are chemotactic for human neutrophils: a new paradigm for the pathogenesis of emphysema. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 26(6), pp.723-30.
- Peacock, J.L. et al., 2011. Outdoor air pollution and respiratory health in patients with COPD. *Thorax*, 66(7), pp.591-6.
- Persson, C. et al., 2006. Do native and polymeric alpha1-antitrypsin activate human neutrophils in vitro? *Chest*, 129(6), pp.1683-92.
- Piitulainen, E. & Eriksson, S., 1999. Decline in FEV1 related to smoking status in individuals with severe alpha1-antitrypsin deficiency (PiZZ). *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 13(2), pp.247-51.
- Piitulainen, E. & Sveger, T., 1998. Effect of environmental and clinical factors on lung function and respiratory symptoms in adolescents with alpha1-antitrypsin deficiency. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, 87(11), pp.1120-4.
- Piitulainen, E. & Sveger, T., 2002. Respiratory symptoms and lung function in young adults with severe alpha(1)-antitrypsin deficiency (PiZZ). *Thorax*, 57(8), pp.705-8.
- Piitulainen, E., Tornling, G. & Eriksson, S., 1997. Effect of age and occupational exposure to airway irritants on lung function in non-smoking individuals with alpha 1-antitrypsin deficiency (PiZZ). *Thorax*, 52(3), pp.244-8.
- Puhan, M.A. et al., 2005. Respiratory rehabilitation after acute exacerbation of COPD may reduce risk for readmission and mortality -- a systematic review. *Respiratory research*, 6, p.54.
- Pääkkö, P. et al., 1996. Activated neutrophils secrete stored alpha 1-antitrypsin. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 154(6 Pt 1), pp.1829-33.
- Rabe, K.F. et al., 2007. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 176(6), pp.532-55.
- Rembert Koczulla, A. et al., 2011. Alpha-1 antitrypsin is elevated in exhaled breath condensate and serum in exacerbated COPD patients. *Respiratory medicine*.
- Riise, G.C. et al., 1995. Bronchial inflammation in chronic bronchitis assessed by measurement of cell products in bronchial lavage fluid. *Thorax*, 50(4), pp.360-5.
- Sack, U. et al., 2006. Multiplex analysis of cytokines in exhaled breath condensate. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 69(3), pp.169-72.

- Salcedo, R. et al., 2000. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood*, 96(1), pp.34-40.
- Seemungal, T.A.R., Hurst, J.R. & Wedzicha, J.A., 2009. Exacerbation rate, health status and mortality in COPD--a review of potential interventions. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, 4, pp.203-23.
- Seersholm, N. et al., 1997. Does alpha1-antitrypsin augmentation therapy slow the annual decline in FEV1 in patients with severe hereditary alpha1-antitrypsin deficiency? Wissenschaftliche Arbeitsgemeinschaft zur Therapie von Lungenerkrankungen (WATL) alpha1-AT study group. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 10(10), pp.2260-3.
- Seersholm, N., Kok-Jensen, A. & Dirksen, A., 1995. Decline in FEV1 among patients with severe hereditary alpha 1-antitrypsin deficiency type PiZ. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 152(6 Pt 1), pp.1922-5.
- de Serres, F.J., 2002. Worldwide racial and ethnic distribution of alpha1-antitrypsin deficiency: summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys. *Chest*, 122(5), pp.1818-29.
- Shahid, S.K. et al., 2002. Increased interleukin-4 and decreased interferon-gamma in exhaled breath condensate of children with asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 165(9), pp.1290-3.
- Soejima, K. et al., 2000. Longitudinal follow-up study of smoking-induced lung density changes by high-resolution computed tomography. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 161(4 Pt 1), pp.1264-73.
- van Steenbergen, W., 1993. Alpha 1-antitrypsin deficiency: an overview. *Acta clinica Belgica*, 48(3), pp.171-89.
- Stockley, R. a., 2002. The Effect of Augmentation Therapy on Bronchial Inflammation in alpha1-Antitrypsin Deficiency. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 165(11), pp.1494-1498.
- Stockley, Robert A et al., 2000. Bronchial Inflammation * : Bronchial Inflammation * Its Relationship to Colonizing Microbial Load and α 1 -Antitrypsin. *Chest*.
- Stolk, J. et al., 2007. Progression parameters for emphysema: a clinical investigation. *Respiratory medicine*, 101(9), pp.1924-30.
- Stoller, J K, 1997. Clinical features and natural history of severe alpha 1-antitrypsin deficiency. Roger S. Mitchell Lecture. *Chest*, 111(6 Suppl), p.123S-128S.

- Stoller, James K et al., 2005. Delay in diagnosis of alpha1-antitrypsin deficiency: a continuing problem. *Chest*, 128(4), pp.1989-94.
- Strange, C. et al., 2006. Results of a survey of patients with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Respiration; international review of thoracic diseases*, 73(2), pp.185-90.
- Strife, C.F. et al., 1983. Membranoproliferative glomerulonephritis and alpha 1-antitrypsin deficiency in children. *Pediatrics*, 71(1), pp.88-92.
- Subramaniam, D. et al., 2010. Effects of alpha 1-antitrypsin on endotoxin-induced lung inflammation in vivo. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 59(7), pp.571-8.
- Summary, E., 2003. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency.
- Sveger, T., 1976. Liver disease in alpha1-antitrypsin deficiency detected by screening of 200,000 infants. *The New England journal of medicine*, 294(24), pp.1316-21.
- Tabak, C. et al., 2001. Alcohol consumption in relation to 20-year COPD mortality and pulmonary function in middle-aged men from three European countries. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 12(2), pp.239-45.
- Taggart, C. et al., 2000. Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. *The Journal of biological chemistry*, 275(35), pp.27258-65.
- Tate, S. et al., 2002. Airways in cystic fibrosis are acidified: detection by exhaled breath condensate. *Thorax*, 57(11), pp.926-9.
- Tobin, M.J., Cook, P.J. & Hutchison, D.C., 1983. Alpha 1 antitrypsin deficiency: the clinical and physiological features of pulmonary emphysema in subjects homozygous for Pi type Z. A survey by the British Thoracic Association. *British journal of diseases of the chest*, 77(1), pp.14-27.
- Traulsen, J.B., 1994. [Panniculitis associated with severe alpha 1-antitrypsin deficiency]. *Ugeskrift for laeger*, 156(10), pp.1474-5.
- Troosters, T. et al., 2010. Resistance training prevents deterioration in quadriceps muscle function during acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 181(10), pp.1072-7.
- Ueno, T. et al., 2008. Inflammatory markers in exhaled breath condensate from patients with asthma. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 13(5), pp.654-63.

- Venembre, P. et al., 1994. Secretion of alpha 1-antitrypsin by alveolar epithelial cells. *FEBS letters*, 346(2-3), pp.171-4.
- Vogelmeier, C. et al., 2007. [Guidelines for the diagnosis and therapy of COPD issued by Deutsche Atemwegsliga and Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin]. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)*, 61(5), pp.e1-40.
- Voulgari, F. et al., 1982. Serum levels of acute phase and cardiac proteins after myocardial infarction, surgery, and infection. *British heart journal*, 48(4), pp.352-6.
- Weber, K.S. et al., 1999. Expression of CCR2 by endothelial cells : implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 19(9), pp.2085-93.
- Wencker, M. et al., 2001. Longitudinal follow-up of patients with alpha(1)-protease inhibitor deficiency before and during therapy with IV alpha(1)-protease inhibitor. *Chest*, 119(3), pp.737-44.
- Wewers, M.D. et al., 1987. Replacement therapy for alpha 1-antitrypsin deficiency associated with emphysema. *The New England journal of medicine*, 316(17), pp.1055-62.
- Woolhouse, I.S., Bayley, D.L. & Stockley, R A, 2002. Sputum chemotactic activity in chronic obstructive pulmonary disease: effect of alpha(1)-antitrypsin deficiency and the role of leukotriene B(4) and interleukin 8. *Thorax*, 57(8), pp.709-14.
- van 't Wout, E.F.A. et al., 2011. Alpha-1 Antitrypsin Production by Pro- and Anti-Inflammatory Macrophages and Dendritic Cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*.
- Zhou, H. & Fischer, H.P., 1998. Liver carcinoma in PiZ alpha-1-antitrypsin deficiency. *The American journal of surgical pathology*, 22(6), pp.742-8.
- Zieliński, J., 1998. Long-term oxygen therapy in COPD patients with moderate hypoxaemia: does it add years to life? *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 12(4), pp.756-8.
- Zietkowski, Z. et al., 2009. High-sensitivity C-reactive protein in the exhaled breath condensate and serum in stable and unstable asthma. *Respiratory medicine*, 103(3), pp.379-85.

7 Anhang

- Patientenfragebogen
- Lebenslauf
- Publikationen
- Verzeichnis meiner akademischen Lehrer
- Danksagung
- Ehrenwörtliche Erklärung

— Erfassungsbogen AATD —

Name: ♀ ☐ ♂ ☐
Geburtsdatum: _____ Datum: _____
Adresse: _____ Uhrzeit: _____
Telefonnummer: _____

Einverständniserklärung Lungenfunktion Blutentnahme Serum für IEF
Ja ☐ Nein ☐ Ja ☐ Nein ☐ Ja ☐ Nein ☐ Ja ☐ Nein ☐

Letzte Medikation: _____ Einnahmezeit _____
Letzte Mahlzeit: _____ Einnahmezeit _____

seit	Beschwerden	Medikation

Behandlung: Hausarzt ☐ _____ Spezialist ☐ _____

Raucher: Ja ☐ Nein ☐ seit: _____ Packungsjahre: _____ aufgehört
Ja ☐ Nein ☐

Letzte Zigarette: _____ Urlaub: _____
Datum Uhrzeit Datum Urlaubsziel

Tumor: _____ Histologie Beschwerden Therapie

Andere Studien:

Aktuelle Medikation:

Lebenslauf

Persönliche Daten

<i>Vor- und Zuname</i>	Severin Thomas Schmid
<i>Geburtsdatum, -ort</i>	geb. am 14.1.1986 in Aschaffenburg, Deutschland
<i>Staatsangehörigkeit</i>	deutsch
<i>Familienstand</i>	ledig, keine Kinder

Schulischer Werdegang

<i>07/1992 – 08/1996</i>	Grundschule Frankfurt, Nieder-Erlenbach
<i>09/1996 – 07/2005</i>	Georg-Büchner-Gymnasium, Bad Vilbel
<i>08/2002 – 07/2003</i>	Sodus Central School, High-School, Sodus, New York (USA)
<i>07/2005</i>	Abitur

Beruflicher Werdegang

<i>10/2005 – 09/2007</i>	Studium der Humanmedizin an der Johann-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt am Main
<i>09/2007</i>	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
<i>10/2007 – 12/2011</i>	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg

Famulaturen

<i>08/2008</i>	Herz-Thorax-Chirurgie: Tongji Medical Faculty, Wuhan (China)
<i>09/2008</i>	Neurochirurgie: Tongji Medical Faculty, Wuhan (China)
<i>09/2009</i>	Intensivstation mit pneumologischem Schwerpunkt: Universitätsklinikum Marburg

Anhang

02/2010

Innere Medizin: Praxis Dr. H. Kriszeleit, Oberursel

08/2010 – 07/2011

Praktisches Jahr

Universitätsklinikum Marburg, Klinik für
Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie

Universitätsklinikum Marburg, Klinik für
Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

McGill University Hospital, Montreal General
Hospital, Montreal (Canada), Klinik für
Thoraxchirurgie

Auguste-Viktoria-Klinikum Berlin, Klinik für
Neurologie

12/2011

Staatsexamen der Humanmedizin

Seit 05/2012

Assistenzarzt in der Abteilung für Thoraxchirurgie am
Universitätsklinikum Freiburg

Promotion

Seit 10/2008

Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt
Pneumologie, Universitätsklinikum Gießen und
Marburg, Standort Marburg

Titel: „Die Effekte der Augmentationstherapie auf
systemische sowie pulmonale Inflammationsmarker
beim hereditären α 1-Antitrypsinmangel“

Betreuer Prof. Dr. med. Claus Vogelmeier
und PD Dr. med. Rembert Koczulla

Publikationen

- Schmid, S.**, Koepke, J., Dresel M., Hattesoht, A., Frenzel, E., Pérez J, Lomas, D.A., Miranda, E., Greulich, T., Noeske, S., Wencker M, Vogelmeier, C., Janciauskiene, S., & Koczulla, A.R. (2012) The effects of weekly augmentation therapy in individuals with α 1-antitrypsin deficiency. *Angenommen zur Publikation im "International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease"*.
- Koczulla, A.R., Noeske, S., Herr, C., Koepke, J., Jörres, R. A., Nell, C., **Schmid, S.**, et al. (2012) Alpha-1 antitrypsin is elevated in exhaled breath condensate and serum in exacerbated COPD patients. *Respiratory Medicine*; 106(1): 120-126
- Koczulla, A.R., Greulich, T., **Schmid, S.**, Kenn, K., Heinzelmann, I., & Vogelmeier, C. (2011) COPD. *Der Pneumologe*; 8(5): 359-371
- Hattesoht, A., Jörres, R. A., Dressel, H., **Schmid, S.**, Vogelmeier, C., Greulich, T., Noeske, S., et al. (2011) Discrimination between COPD with and without alpha 1-antitrypsin deficiency using an electronic nose. *Respirology*; 16: 1258–1264
- Koczulla, A.R., Hattesoht, A., **Schmid, S.**, Bödeker, B., Maddula, S., & Baumbach, J. I. (2011) MCC/IMS as potential noninvasive technique in the diagnosis of patients with COPD with and without alpha 1-antitrypsin deficiency. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry*; 7: 1-9
- Hüttmann, E.-M., Greulich, T., Hattesoht, A., **Schmid, S.**, Noeske, S., Herr, C., John, G., et al. (2011) Comparison of Two Devices and Two Breathing Patterns for Exhaled Breath Condensate Sampling. *PLoS ONE*; 6(11)
- Koczulla, A.R., Noeske, S., Herr, C., Dette, F., Pinkenburg, O., **Schmid, S.**, Jörres, R. A., et al. (2010) Ambient temperature impacts on pH of exhaled breath condensate. *Respirology*; 15 (1): 155-159

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg und Frankfurt:

Bals, Barth, Bartsch, Baum, Behr, Berger, Bien, Donner-Banzhoff, Engenhardt-Cabillic, Ferri, Fuchs-Winkelmann, Görg, Hertl, Hofmann, Hoyer, Kann, Klingmüller, Klose, Koczulla, Korf, Kühnert, Leonhart, Lohoff, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Müller, Müller-Esterl, Neubauer, Nürnberger, Oertel, Pagenstecher, Renz, Richter, Rothmund, Röper, Ruchholtz, Schäfer, Schmidt, Sekundo, Vogelmeier, Wagner, Westermann, Wulff

Danksagung

Danken möchte ich

Herrn PD Dr. med. Andreas Rembert Koczulla für die Möglichkeit meine Arbeit und Ideen in seiner Arbeitsgruppe unter intensiver Unterstützung umzusetzen sowie die menschlich und wissenschaftlich stets hervorragende Betreuung,

Herrn Prof. Dr. med Claus Vogelmeier für die Bereitstellung des guten Arbeitsumfeldes in der Abteilung für Pneumologie des Universitätsklinikums Marburg,

Akira Hattesoehl für die hervorragende Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung bei der Umsetzung der Projekte,

Frau Dr. Janine Koepke für die produktive Zusammenarbeit, konstruktive Diskussion und umfassende Unterstützung bei der Durchführung einiger Versuche,

den anderen Kollegen aus dem Labor, im Besonderen Thomas Damm, Anette Püchner, Marc Dresel und Dr. Timm Greulich,

meinen Eltern für die immerwährende, bedingungslose Unterstützung,

meinem Bruder Fabian,

Nicolas Ritter für die Erstellung der Grafiken.